

**PENINGKATAN KOMPETENSI UJI MIKROBIOLOGI PETUGAS
LABORATORIUM KARANTINA IKAN DI BADAN KARANTINA IKAN
PENGENDALIAN MUTU DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
MELALUI PENDIDIKAN DAN PELATIHAN**

SKRIPSI

**Diajukan kepada Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta
untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan
guna Memperoleh Gelar Sarjana Pendidikan Teknik**



Oleh

Yahya Tri Laksana

09502247009

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN TEKNIK ELEKTRONIKA
FAKULTAS TEKNIK
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA**

2013

LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi yang berjudul “Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Petugas Laboratorium Karantina Ikan di Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Melalui Pendidikan dan Pelatihan” ini telah disetujui oleh pembimbing untuk diujikan.

Yogyakarta, 19 Desember 2012.

Pembimbing

Masduki Zakaria, MT

NIP. 19640917 198901 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN

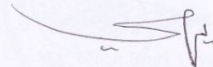
Yang bertandatangan di bawah ini saya:

Nama : Yahya Tri Laksana
NIM : 09502247009
Program Studi : Pendidikan Teknik Elektronika
Judul Skripsi : Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi
Petugas Laboratorium Karantina Ikan di
Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan
Keamanan Hasil Perikanan Melalui
Pendidikan dan Pelatihan

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang telah lazim.

Tanda tangan dosen penguji yang tertera dalam halaman pengesahan adalah asli. Jika tidak asli, saya siap menerima sanksi ditunda yudisium pada periode berikutnya.

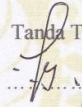

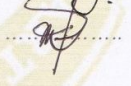
Yogyakarta, 17 Januari 2013



Yahya Tri Laksana
NIM. 09502247009

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Petugas Laboratorium Karantina Ikan di Badan karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Melalui Pendidikan dan Pelatihan” ini telah dipertahankan di depan Dewan Penguji pada tanggal 09-01-2013 dan dinyatakan lulus.

DEWAN PENGUJI			
Nama	Jabatan	Tanda Tangan	Tanggal
1. Masduki Zakaria, MT	Ketua Penguji		17/01/2013
2. Umi Rochayati, MT	Sekretaris Penguji		17/01-2013
3. Suparman, M. Pd.	Penguji Utama		17/01/2013

Yogyakarta, 21 Januari 2013

Fakultas Teknik

Dekan,



Dr. Moch Efuri Triyono, M.Pd
NIP.19560216 198603 1 003

MOTTO

- ❖ *Bersyukur adalah modal untuk mendapatkan nikmat Alloh yang lebih besar.*
- ❖ *Hidup adalah perjuangan, jangan pernah menyerah sampai berhasil meraih cita-cita dan tujuan.*
- ❖ *Selalu positif thinking untuk mendapatkan hasil yang baik.*

PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan untuk:

❖ *Keluargaku tercinta: Bapak Admosugito, Ibu Sugiharini, Kakakku Handri Mursiti,*

dan Dwi Halimah yang telah memberikan banyak sekali dukungan material maupun spiritual serta kasih sayang. Terimakasih untuk semuanya.

❖ *Tertiku Indah Rusdiati dan anakku Fany Laksana Alafaaf tersayang yang selalu menjadi penyejuk hati dan penyemangatku.*

**PENINGKATAN KOMPETENSI UJI MIKROBIOLOGI PETUGAS
LABORATORIUM KARANTINA IKAN DI BADAN KARANTINA IKAN,
PENGENDALIAN MUTU, DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
MELALUI PENDIDIKAN DAN PELATIHAN**

Oleh
Yahya Tri Laksana
09502247009

ABSTRAK

Laju arus globalisasi yang semakin terlihat nyata menuntut kemajuan teknologi di segala bidang. Aparatur pemerintah yang berfungsi sebagai subjek pelaksana pembangunan dituntut mempunyai kompetensi. Salah satu cara untuk meningkatkan kompetensi adalah dengan mengadakan Pendidikan dan Pelatihan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana peningkatan kompetensi uji mikrobiologi petugas Laboratorium Karantina Ikan di Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) melalui pendidikan dan pelatihan.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian observasi. Populasi penelitian ini adalah 22 peserta pendidikan dan pelatihan apresiasi peningkatan kompetensi uji mikrobiologi penggunaan RT-PCR Rotorgene dan *Applied biosystem step one*. Instrumen penelitian berupa soal pretest dan posttest. Analisis data yang digunakan untuk menganalisa data hasil penelitian adalah analisa data deskriptif dan analisa data inferensial dengan menggunakan uji t (*t-test*) berpasangan.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan kompetensi Petugas Laboratorium Karantina Ikan BKIPM setelah menjalani pendidikan dan pelatihan dengan metode kuliah teori dengan bobot 40% serta praktek langsung di laboratorium dengan bobot 60%. Rata-rata nilai pretest peserta adalah 6,00 dan rata-rata nilai posttest 7,76. Berdasarkan hasil perhitungan uji t-test menunjukkan nilai $P < \alpha$ ($0.001 < 0.05$) dan nilai t hitung $> t$ tabel ($3,73 > 2,093$). Dapat disimpulkan bahwa kompetensi peserta meningkat secara signifikan setelah menjalani pendidikan dan pelatihan.

Kata Kunci: Penelitian observasi, peningkatan kompetensi, analisa data deskriptif dan inferensial.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirobbil'aalamiin, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan anugerah kepada setiap hamba-hambaNya yang beriman dan berikhtiar. Shalawat serta salam juga tidak lupa penulis kirimkan kepada junjungan kita Nabi Besar Muhammad SAW yang telah memberikan teladan mulia dalam menuntun umatnya.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat kelulusan bagi setiap mahasiswa Universitas Negeri Yogyakarta (UNY). Selain itu juga merupakan suatu bukti bahwa mahasiswa telah menyelesaikan kuliah jenjang program Strata-1 dan untuk memperoleh gelar Sarjana Pendidikan.

Terselesaikannya Laporan Skripsi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak yang telah memberikan dorongan moral maupun spiritual dan juga bimbingan ilmu pengetahuan, oleh karena itu pada kesempatan yang sangat berharga ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Rohmat Wahab, M.Pd, MA selaku Rektor Universitas Negeri Yogyakarta.
2. Bapak Dr. Moch Bruri Triyono, M.Pd selaku Dekan Fakultas Teknik Universitas negeri Yogyakarta.

3. Bapak Drs. Muhammad Munir, M.Pd. Selaku Ketua Jurusan Pendidikan Teknik Elektronika.
4. Bapak Handaru Jati, Ph.D selaku Koordinator Program Study sekaligus Koordinator Skripsi Pendidikan Teknik Elektronika.
5. Bapak Masduki Zakaria, MT selaku Pembimbing yang telah memberikan arahan-arahan dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Bapak dan Ibu Dosen Universitas Negeri Yogyakarta yang telah banyak memberikan ilmunya selama penulis kuliah.
7. Bapak Ir. Asep Dadang Koswara, M. Si. Selaku Kepala Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan yang telah memberi ijin pada penulis untuk melakukan penelitian.
8. Dadang Wibowo S, Si. Dan seluruh pegawai BUSKIPM yang telah memberikan bantuan, semangat dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Bapak dan Ibu tercinta yang selalu memberikan semangat, arahan, materi dan yang terpenting doa dan restu kepada penulis selama ini.
10. Istri dan anakku tersayang yang selalu menghibur dan memberi semangat serta dukungan selama ini.
11. Seluruh teman-teman saya di Jogja.

Penulis tentunya menyadari bahwa pembuatan skripsi ini masih banyak sekali kekurangan-kekurangan dan kelemahan-kelemahannya. Oleh karena itu penulis berharap kepada semua pihak agar dapat menyampaikan kritik dan saran

yang membangun untuk menambah kesempurnaan skripsi ini. Namun penulis tetap berharap skripsi ini akan bermanfaat bagi semua pihak yang membacanya.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Yogyakarta, Januari 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
ABSTRAK	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Identifikasi Masalah	10
C. Batasan Masalah	10
D. Rumusan Masalah	10
E. Tujuan Penelitian	11
F. Manfaat Penelitian	11
 BAB II KAJIAN PUSTAKA	
A. Kajian Tentang Pendidikan dan Pelatihan	13
B. Kompetensi uji mikrobiologi penggunaan RT-PCR dan Applied Bio System Step One;	
1. Pengertian kompetensi	20
2. Kompetensi uji mikrobiologi penggunaan RT-PCR dan <i>Applied Biosystem</i>	
<i>Step One</i>	24

C. Penelitian Yang Relevan	30
D. Kerangka Berpikir.....	32
E. Hipotesis	32
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
A. Metode Pengolahan Data	33
B. Waktu dan Tempat.....	36
C. Populasi dan Sampel Penelitian	36
D. Instrument dan Teknik Pengumpulan Data;	
1. Instrument Penelitian	36
2. Uji Instrument	37
3. Teknik Pengumpulan Data	37
 BAB IV HASIL PENELITIAN	
A. Hasil Penelitian	39
B. Pembahasan;	
1. Analisa Data Deskriptif	41
2. Analisa Data Inferensi	42
 BAB V PENUTUP	
A. Kesimpulan.....	46
B. Saran	46
 DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Pemipetan	29
Tabel 2. Nilai pretest dan posttest peserta Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan <i>Applied</i> <i>Biosystem Step One</i>	40
Tabel 3. Representasi Hasil Pretest dan posttest	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Berpikir	32
Gambar 2. Grafik <i>Probability</i> Normalitas Pretest – Posttest (d)	43
Gambar 3. Uji Hipotesis Pretest – Posttest	44

DAFTAR LAMPIRAN

- LAMPIRAN 1. Daftar Peserta Diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One.
- LAMPIRAN 2. Soal Pretest dan Posttest.
- LAMPIRAN 3. Kunci Jawaban Soal Pretest dan Posttest.
- LAMPIRAN 4. Hasil Pretest dan Posttest.
- LAMPIRAN 5. t tabel statistic
- LAMPIRAN 6. Jadwal Kegiatan Diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One
- LAMPIRAN 7. Materi Diklat Apreasiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One.
- LAMPIRAN 8. Foto Dokumentasi Kegiatan Apresiasi Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan RT-PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem step one*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Upaya mewujudkan peningkatan mutu pendidikan senantiasa dilakukan baik oleh pemerintah maupun inisiatif warga masyarakat. Masih rendahnya mutu pendidikan di Indonesia merupakan masalah yang kompleks yang menyangkut berbagai faktor, baik politik, social, ekonomi, budaya, dan sebagainya.

Pengertian mutu secara umum mengandung makna keunggulan suatu produk atau jasa. Era globalisasi ini banyak yang mengatakan sebagai persaingan mutu atau kualitas. Di saat tantangan global sudah menjadi kenyataan yang tidak terelakkan maka banyak kalangan memandang pendidikan sebagai inti dari peningkatan kualitas sumber daya manusia (SDM) untuk mampu berkompetisi dalam lingkup yang sudah tidak mengenal lagi batas geografis sebuah negara (Kustiman, 2004:3). Pada era globalisasi ini manusia dituntut untuk dapat bersaing dalam memenuhi kebutuhan hidupnya dan tentunya tidak akan bisa lepas dari bantuan orang lain, begitu juga dunia industri maupun instansi. Oleh sebab itu diperlukan sumber daya manusia yang handal dan terampil yang siap pakai.

Sehubungan dengan hal tersebut pengembangan sumber daya manusia merupakan sesuatu yang penting mendapat perhatian karena untuk mencapai terwujudnya masyarakat maju, adil, makmur dan mandiri berdasarkan

pancasila perlu adanya sumber daya manusia yang berkualitas, oleh karena itu aparat pemerintah sebagai subyek atau pelaksana pembangunan sangat dibutuhkan sumber daya manusia yang handal dan profesional dibidang tugasnya, seperti yang dikemukakan Said Zainal Abidin (dalam Ginanjar et, al, 1995, 97) bahwa “Pembangunan tanpa pengembangan kemampuan sumber daya manusia tidak dianggap sebagai pembangunan, sebab itu keberhasilan suatu pembangunan pada dirinya pertama-tama diukur pada keberhasilan meningkatkan kemampuan manusia”.

Begitu pula halnya di dalam organisasi pemerintahan di Indonesia, salah satu kunci keberhasilan kegiatan pemerintahan adalah dengan dimiliki sumber daya manusia yang berkualitas, karena itu pengembangan dan perbaikan kualitas aparat negara yang berkedudukan sebagai pelaksana pembangunan dituntut memiliki keahlian, kemampuan dan semangat kerja serta pengabdian yang tinggi dalam melaksanakan tugasnya yang diberikan sehingga dapat bekerja dengan sebaik-baiknya dan mencapai hasil yang optimal.

Jadi yang ditekankan disini adalah betapa pentingnya faktor aparat ini ditingkatkan semangat pengabdian, ketrampilan dan kecakapannya, disiplin kerjanya yang keseluruhannya akan meningkatkan kewibawaan pemerintah.

Dalam menghadapi tantangan era tinggal landas serta persaingan negara-negara maju, aparat pemerintah agar dapat mendukung beban tugas

dan pekerjaan yang menjembatani, kelancaran tinggal landas tersebut dengan mulus. Pemerintah telah berusaha meningkatkan pendayagunaan aparatur dari beberapa aspek strategis yang terdiri dari bidang-bidang kelembagaan, kepegawaian, ketatalaksanaan dan pengawasan operasional, yang meliputi analisis jabatan, pengawasan melekat, serta pendidikan dan pelatihan.

Salah satu usaha yang ditempuh oleh pemerintah dalam meningkatkan pendayagunaan aparturnya adalah dengan mengikutkan ke dalam suatu pendidikan dan pelatihan. Dengan demikian pendidikan dan pelatihan tersebut diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan dan ketrampilan aparat yang bersangkutan, terutama di dalam melaksanakan tugasnya sehingga akan berpengaruh pula pada kualitas dan prestasi kerjanya.

Menyadari pentingnya peranan aparatur pemerintah dalam meningkatkan loyalitas kualitas kerja, dan pengabdian terhadap pekerjaannya terutama dalam menghadapi suasana persaingan yang semakin ketat di lingkungan kerjanya, maka sebagai konsekuensinya adalah kondisi dari aparatur itu sendiri perlu dibina dan dikembangkan. Pemerintah mempunyai perhatian yang serius terhadap pembinaan dan penyempurnaan dalam bentuk menetapkan arah dan kebijaksanaan aparatur pemerintah, hal tersebut telah diamanatkan dalam Garis-Garis Besar Haluan Negara, Ketetapan MPR RI Nomor II/MPR 1993-1998 (1993:13) bahwa “Pembinaan kepegawaian diarahkan pada makin terwujudnya kepegawaian negara yang mantap dengan pengembangan karier berdasarkan prestasi kemampuan profesional, keahlian dan ketrampilan serta kemantapan sikap.”

Salah satu langkah yang diambil oleh pemerintah dalam mewujudkan aparatur pemerintah yang bersih dan berwibawa adalah melalui pembinaan pegawai negeri sipil, dengan menyelenggarakan pendidikan dan pelatihan yang terencana, terpadu sesuai dengan tuntutan pembangunan yang semakin meningkat sehingga diharapkan pegawai sipil dapat meningkatkan pengabdian, mutu, keahlian, kemampuan dan ketrampilan dalam melaksanakan tugas secara bersih, berwibawa dan bertanggung jawab.

Pendidikan dan pelatihan yang diberikan kepada pegawai negeri sipil sebagaimana yang terdapat dalam Peraturan Pemerintah Nomor 14 tahun 1994 tentang Pendidikan dan Pelatihan Jabatan Pegawai Negeri Sipil adalah berupa:

1. Pendidikan dan Pelatihan Prajabatan
2. Pendidikan dan Pelatihan dalam jabatan, dibagi dalam:
 - a. Pendidikan dan Pelatihan Struktural.
 - b. Pendidikan dan Pelatihan Fungsional.
 - c. Pendidikan dan Pelatihan Teknis

Adapun program pengembangan sumber daya manusia sesuai dengan prinsip yang dijelaskan oleh Nimran (1994:72) ada tiga jalur utama yaitu:

1. Jalur pendidikan formal
2. Jalur latihan kerja
3. Jalur pengembangan di tempat kerja

Bertitik tolak dari penjelasan di atas dapat disimpulkan bahwa program pendidikan dan latihan merupakan kegiatan yang penting bagi peningkatan pengetahuan dan ketrampilan.

Berkenaan dengan tujuan pendidikan dan pelatihan di dalam organisasi menurut A.S. Moenir (1987:162) adalah:

1. Memelihara dan meningkatkan kecakapan dan kemampuan dalam menjalankan tugas pekerjaan, baik pekerjaan lama maupun baru, baik dari segi peralatan maupun metoda.
2. Menyalurkan keinginan pegawai untuk maju dari segi kemampuan dan memberikan rasa kebanggaan kepada mereka.

Selanjutnya menurut Peraturan Pemerintah Nomor 14 Tahun 1994 dalam pasal 2, tujuan pendidikan dan pelatihan adalah:

1. Meningkatkan kesetiaan dan ketaatan pegawai negeri sipil kepada Pancasila, Undang-Undang Dasar 1945, Negara dan Pemerintah Republik Indonesia.
2. Menanamkan kesamaan pola pikir yang dinamis dan bernalar agar memiliki wawasan yang komprehensif untuk melaksanakan tugas umum pemerintahan dan pembangunan.

Kualitas sumber daya manusia pada dasarnya terdiri dari 2 aspek, yakni aspek fisik (kualitas fisik) dan aspek non fisik (kualitas non fisik) yang menyangkut kemampuan bekerja, berfikir dan ketrampilan-ketrampilan lain. Oleh karenanya usaha meningkatkan kualitas sumber daya manusia ini

seharusnya diorientasikan pada kedua aspek tersebut. Untuk meningkatkan kualitas bisa diarahkan melalui program-program peningkatan gizi dan kesehatan. Sedangkan untuk meningkatkan kualitas atau kemampuan non fisik tersebut maka upaya pendidikan dan pelatihan adalah yang paling dibutuhkan. Langkah inilah yang dimaksudkan sebagai wujud dari pengembangan sumber daya manusia.

Oleh Sondang P. Siagian (1993:198) dikemukakan bahwa ada empat alasan utama dalam pengembangan sumber daya manusia, yaitu karena:

1. Pengetahuan karyawan yang perlu pemutakhiran, artinya kedaluwarsaan pengetahuan dan ketrampilan tersebut tidak lagi sesuai dengan “tuntutan zaman”.
2. Tidak disangkal bahwa dimasyarakat selalu terjadi perubahan, tidak hanya karena perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, akan tetapi juga karena pergeseran nilai-nilai sosial budaya.
3. Persamaan hak memperoleh pekerjaan, artinya masih ada masyarakat dimana terdapat perbedaan hak dalam perolehan pekerjaan.
4. Kemungkinan perpindahan karyawan, artinya mobilitas karyawan selalu terjadi baik pada tingkat managerial, profesional bahkan juga pada tingkat teknis operasional.

Memperhatikan rumusan di atas jelas bahwa pengembangan sumber daya manusia Pegawai Negeri Sipil (PNS) harus selalu dilaksanakan, serta terprogram waktu serta penjenjangannya, dengan demikian akan

meningkatkan kompetensi SDM PNS dalam melaksanakan tugas dan memiliki loyalitas, andal serta berkualitas, berpotensi, berwawasan luas yang mampu mengikuti perkembangan iptek, dan memiliki imtaq yang sempurna.

Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) terbentuk melalui PERPRES No. 24 Tahun 2010, sebagai salah satu upaya pemerintah dalam memenuhi tuntutan reformasi dan birokrasi. Keberadaan BKIPM juga diperkuat dengan peraturan atau kebijakan, dan juga didukung oleh suatu sistem tata kerja yang bersinergi antara BKIPM dengan unit kerja lingkup Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP), dan unit kerja lainnya, baik Pusat maupun Daerah. BKIPM mempunyai beberapa peranan yang strategis, antara lain:

1. melindungi NKRI dari masuk dan tersebarnya Hama dan Penyakit Ikan (HPIK) Karantina golongan Parasit, Jamur, Bakteri, dan Virus sesuai Kepmen No.03/MEN/2010, dari luar negeri dan mencegah terjadinya penyebaran HPIK antar area di dalam wilayah NKRI;
2. melindungi masyarakat Indonesia terhadap masuknya produk perikanan yang tidak aman untuk dikonsumsi; dan
3. menjaga citra bangsa melalui pengendalian sistem jaminan keamanan hasil perikanan sesuai dengan ketentuan yang berlaku secara internasional, atau yang diberlakukan oleh negara mitra.

Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM) berdasarkan Peraturan Menteri Kelautan dan

Perikanan (PERMEN) Nomor PER.25/MEN/2011, tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan mempunyai tugas “melaksanakan pengujian dan pengembangan teknik dan metode pengujian karantina ikan, mutu, dan keamanan hasil perikanan dalam rangka uji standar karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan”.

Dalam melaksanakan tugas diatas, Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM) menyelenggarakan fungsi:

1. pelaksanaan pengujian HPIK, mutu, dan keamanan hasil perikanan dalam rangka uji standar HPIK, mutu, dan keamanan hasil perikanan;
2. pengembangan teknik dan metode pengujian HPIK, mutu, dan keamanan hasil perikanan;
3. pelaksanaan uji profisiensi;
4. pelaksanaan rancangan standarisasi metode pengujian karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan;
5. pembuatan koleksi standar media pembawa dan/atau HPIK;
6. penyiapan bahan informasi dan publikasi hasil pengujian laboratorium karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan;
7. pelaksanaan kerjasama teknis laboratorium nasional dan internasional;
8. pelaksanaan bimbingan teknis laboratorium;
9. pengumpulan dan pengolahan data; dan
10. pelaksanaan urusan tata usaha dan rumah tangga.

Dalam rangka menjamin keberhasilan pelaksanaan tugas dan fungsi (tusi) BUSKIPM serta mendukung visi dan misi Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan, terutama dalam pengembangan metode dan teknologi laboratorium diperlukan peningkatan kemampuan Sumber Daya Manusia (SDM) petugas laboratorium karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan yang berkelanjutan. BUSKIPM menyelenggarakan pelatihan dengan kegiatan Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time-PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* untuk menjawab tuntutan di atas.

Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time-PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* tersebut merupakan salah satu upaya peningkatan kompetensi petugas karantina ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan dalam hal pengembangan metode dan teknologi laboratorium.

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan di atas penulis tertarik untuk melaksanakan penelitian dengan judul: **“Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Petugas Laboratorium Karantina Ikan di Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Melalui Pendidikan dan Pelatihan.”**

B. Identifikasi Masalah

Melihat latar belakang masalah yang telah penulis paparkan tersebut, serta membaca dokumentasi dan referensi seputar profil Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM), terdapat beberapa permasalahan yang ingin diangkat. Beberapa permasalahan tersebut dapat diidentifikasi sebagai berikut:

1. Bagaimana pelaksanaan pendidikan dan pelatihan pada BKIPM.
2. Bagaimana metode pendidikan dan pelatihan yang diterapkan pada BKIPM.
3. Bagaimana peran pendidikan dan pelatihan dalam usaha peningkatan kompetensi pegawai BKIPM.

C. Batasan Masalah

Karena adanya keterbatasan waktu, tenaga, biaya, teori-teori yang mendukung, serta agar penelitian dapat dilakukan dengan seksama dan mendalam, peneliti membatasi permasalahan yang akan diteliti yaitu: Apakah terdapat peningkatan kompetensi uji mikrobiologi petugas laboratorium karantina ikan di BKIPM setelah adanya diklat.

D. Rumusan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah yang penulis paparkan di atas dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah yang hendak diteliti sebagai berikut:

1. Bagaimana pelaksanaan pendidikan dan pelatihan pada BKIPM?
2. Sejauh mana peningkatan kompetensi uji mikrobiologi petugas laboratorium BKIPM dengan adanya diklat?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengetahui peningkatan kompetensi uji mikrobiologi RT-PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* petugas laboratorium karantina ikan di Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan melalui pendidikan dan pelatihan, khususnya metode yang berkaitan dengan pengujian mikrobiologi menggunakan Real Time PCR.

F. Manfaat Penelitian

1. Bagi Penulis
 - a. menerapkan ilmu pengetahuan yang pernah diperoleh saat kuliah
 - b. membuat karya ilmiah sebagai bukti turut berperan serta dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang pendidikan teknik Elektronika
 - c. sebagai salah satu syarat kelulusan program studi Strata 1 jurusan Pendidikan Teknik Elektronika UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA untuk memperoleh gelar Sarjana Pendidikan teknik (S.Pd.T)
2. Bagi UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

- a. Dokumentasi karya ilmiah mahasiswa dalam bentuk laporan skripsi.
 - b. Memperkaya referensi penulisan karya ilmiah dalam bentuk laporan skripsi bagi mahasiswa yang sedang mengambil skripsi
3. Bagi Badan Karantina Ikan Pengendali Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Jakarta
- a. Sebagai bahan untuk melengkapi referensi tentang pelaksanaan kegiatan pendidikan dan pelatihan periode berikutnya.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Kajian tentang Pendidikan dan Pelatihan

Menurut Wexley dan Yulk yaitu: “Pelatihan dan pengembangan merupakan istilah-istilah yang berhubungan dengan usaha-usaha berencana, yang diselenggarakan untuk mencapai penguasaan skill, pengetahuan, dan sikap-sikap pegawai atau anggota organisasi. Pengembangan lebih difokuskan pada peningkatan kemampuan dan pengambilan keputusan dan memperluas hubungan manusia (*human relation*). Bagi manajemen tingkat atas dan manajemen tingkat menengah, sedangkan pelatihan dimaksudkan untuk pegawai pada tingkat bawah (pelaksana)”¹

Menurut Andrew E. Sikula yaitu: ”Pelatihan (training) adalah suatu proses pendidikan jangka pendek yang mempergunakan prosedur sistematis dan terorganisasi, pegawai non manajerial mempelajari pengetahuan dan keterampilan teknis dalam tujuan terbatas. Pengembangan merupakan suatu proses pendidikan jangka panjang yang mempergunakan prosedur sistematis.”²

Dengan demikian, istilah pelatihan ditujukan pada karyawan pelaksana untuk meningkatkan pengetahuan dan keterampilan teknis, sedangkan pengembangan ditujukan untuk karyawan tingkat manajerial untuk

¹ Anwar Prabu Mangkunegara. Perencanaan dan pengembangan Sumber Daya Manusia. PT. Refika Aditama. Bandung. 2007. Hal. 50

² Anwar Prabu Mangkunegara. Perencanaan dan pengembangan sumber Daya Manusia PT. Refika Aditama. Bandung. 2007. Hal. 50

meningkatkan kemampuan konseptual, kemampuan dalam pengambilan keputusan, dan memperluas *human relation*.

” pendidikan dan pelatihan adalah merupakan upaya untuk mengembangkan sumber daya manusia tertentu untuk mengemangkan kemampuan intelektual dan kepribaian manusia. Penggunaan istilah pendidikan dan pelatihan dalam suatu institusi atau organisai biasanya disatukan menjadi diklat (pendidikan dan pelatihan). Unit yang menangani pendidikan dan pelatihan pegawai atau karyawan lazim disebut pusklat (pusat pendidikan dan pelatihan)”³

” Pelatihan dapat didefinisikan sebagai suatu cara yang digunakan untuk memeberikan atau meningkatkan keterampilan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pekerjaannya sekarang. Sebagai contoh, pelatihan dapat digunakan untuk menunjukan cara untuk mengoperasikan mesin baru kepada mekanis baru, atau tentang cara menjual produk kepada tenaga penjual baru dan tentang cara bagaimana melaksanakan interview dan menilai karyawan kepada penyelia baru”⁴

Dari definisi di atas bahwasanya pelatihan sangatlah diperlukan untuk pengembangan atau kemampuan diri karyawan, untuk keuntungan bersama antara diri karyawan dan perusahaan. Dengan pelatihan karyawan dapat mampu menguasai bidang pekerjaannya.

³ Prof. Dr. Soekidjo Notoatmodjo. Pengembangan Sumber Daya Manusia. Rienka Cipta. Jakarta. 2003. Hal. 29

⁴ Dr. Mutiara S. panggabean. Manajemen Sumber Daya Manusia. Ghalia. Indonesia. Bogor. 2004. Hal. 41

1. Tujuan Pelatihan

Pada umumnya, pelatihan dilakukan untuk kepentingan karyawan, perusahaan dan konsumen.

a. Karyawan

- 1) Memberikan keterampilan dan pengetahuan yang diperlukan
- 2) Meningkatkan moral karyawan dengan keterampilan dan keahlian yang sesuai dengan pekerjaannya mereka akan antusias untuk menyelesaikan pekerjaan dengan baik.
- 3) Memperbaiki kinerja. Karyawan yang bekerja secara tidak memuaskan karena kekurangan keterampilan dapat diminimalkan melalui program pelatihan dan pengembangan
- 4) membantu karyawan dalam menghadapi perubahan-perubahan, baik perubahan struktur organisasi, teknologi maupun sumber daya manusianya. Melalui pelatihan dan pengembangan karyawan diharapkan dapat secara efektif menggunakan teknologi baru. Manajer disemua bidang harus secara konstan mengetahui kemajuan teknologi yang membuat organisasi berfungsi secara lebih efektif.
- 5) Meningkatkan karier karyawan. Dengan pelatihan kesempatan untuk meningkatkan karier menjadi besar karena keahlian, keterampilan dan prestasi kerja lebih baik.
- 6) Meningkatkan jumlah balas jasa yang dapat diterima karyawan. Dengan pelatihan dan pengembangan, maka

keterampilan semakin meningkat dan prestasi kerja semakin baik dan gaji juga akan meningkat karena kenaikan gaji didasarkan prestasi.

b. Perusahaan

- 1) Memenuhi kebutuhan-kebutuhan perencanaan Sumber Daya Manusia. Dengan pelatihan dan pengembangan perusahaan melakukan upaya bersama untuk secara benar mendapatkan sumber daya manusia yang memenuhi kebutuhan perusahaan.
- 2) Penghematan. Pelatihan dapat mengurangi biaya produksi karena pelatihan dimaksudkan untuk meningkatkan keterampilan karyawan, jika karyawan lebih terampil, maka pekerjaan lebih cepat selesai, penggunaan bahan baku lebih hemat, dan bisa menggunakan mesin-mesin dengan lebih baik
- 3) Mengurangi tingkat kerusakan dan kecelakaan dengan pelatihan dapat mengurangi kerusakan barang, produksi, mesin-mesin dan tingkat kecelakaan karyawan karena keterampilan karyawan telah meningkat hal ini dapat mengurangi biaya yang harus dikeluarkan oleh perusahaan
- 4) Memperkuat komitmen karyawan organisasi yang gagal menyediakan pelatihan akan kehilangan karyawan yang orientasi pencapaian yang merasa frustrasi karena merasa tidak ada kesempatan untuk promosi dan akhirnya memilih keluar

untuk mencari perusahaan lain yang menyediakan pelatihan bagi kemajuan karier mereka

c. Konsumen

- 1) konsumen akan memperoleh produk yang lebih baik dalam hal kualitas dan kuantitas.
- 2) meningkatkan pemberian pelayanan, karena pemberian pelayanan yang baik merupakan daya tarik yang sangat penting bagi rekanan perusahaan yang bersangkutan. Ini berarti bahwa, dengan adanya pelatihan akan memberi manfaat yang lebih baik bagi konsumen. Mereka dapat memperoleh produk atau pelayanan yang lebih baik pada waktunya

2. Tahapan-tahapan Penyusunan Pelatihan

- a. penentuan kebutuhan pelatihan
- b. desain program pelatihan
- c. evaluasi program pelatihan

3. Komponen-komponen Pelatihan

- a. tujuan dan sasaran pelatihan harus jelas dan dapat diukur
- b. para pelatih harus ahlinya yang berkualitas memadai
- c. materi pelatihan harus disesuaikan dengan tujuan yang hendak dicapai
- d. metode pelatihan harus disesuaikan dengan tingkat kemampuan karyawan yang menjadi peserta
- e. peserta pelatihan harus memenuhi persyaratan yang telah ditentukan

f. Implementasi Pelatihan

1). Peserta

- a). karyawan baru
- b). karyawan lama

2).Pelatih

- a). pelatih internal
- b). pelatih eksternal
- c). pelatihan gabungan internal dan eksternal

4. Tempat Pelatihan

Pelatihan dapat dilakukan pada tempat terbuka dan tempat tertutup (on site dan of site) pelatihan terbuka

a. Keuntungan of site (pelatihan tertutup)

- 1). mengurangi biaya pelatihan
- 2). menghapus biaya transportasi
- 3). jadwal pelatihan fleksibel
- 4). mengurangi gangguan operasi sehari-hari

b. Keuntungan on site antara lain (pelatihan terbuka)

memberikan kesan kepada karyawan bahwa kualitas itu sungguh-sungguh penting, sehingga perusahaan berupaya untuk mengadakan pelatihan diluar perusahaan

- 1). gangguan lebih sedikit
- 2). lebih sedikit instruksi

- 3). educational setting yang ada lebih sesuai dengan ukuran dan komposisi kelas

5. Penyebab kegagalan pelatihan

Tidak selamanya suatu pelatihan yang dilakukan akan berhasil, bahkan banyak pelatihan yang gagal. Banyak faktor yang menyebabkan kegagalan suatu pelatihan. Misalnya:

- a. pengajaran yang tidak baik
- b. materi kurikulum pelatihan yang tidak tepat
- c. perencanaan yang kurang bagus
- d. dana yang tidak memadai
- e. kurangnya komitmen

6. Evaluasi Pelatihan

Evaluasi pelatihan dimulai dari pernyataan tujuan yang jelas. Tujuan yang luas tidak akan membingungkan bila dibuatkan sasaran pelatihan yang lebih spesifik. Tujuan pelatihan merupakan konsep yang luas. Sasaran tersebut menerjemahkan tujuan tersebut. Menjadi lebih spesifik dan dapat diukur.

Tujuan pelatihan adalah untuk meningkatkan pengetahuan, keterampilan, serta meningkatkan kualitas dan produktifitas secara keseluruhan sehingga organisasi secara keseluruhan sehingga organisasi lebih kompetitif dengan kata lain tujuan pelatihan adalah telah meningkatkan kinerja, untuk mengetahui apakah pelatihan telah meningkatkan kinerja, manajer perlu mengetahui 3 hal sebagai berikut:

- a. apakah pelatihan yang diberikan itu sah
- b. apakah karyawan mempelajarinya
- c. sudahkah kegiatan pembelajaran tersebut menimbulkan perbedaan tahapan mengevaluasi validitas pelatihan
- a. membandingkan dokumen tertulis mengenai pelatihan
- b. menentukan apakah pelatihan yang diberikan benar-benar konsisten dengan dokumentasi tersebut

B. kompetensi uji mikrobiologi penggunaan RT-PCR dan Applied Bio System Step One

1. Pengertian kompetensi

Menurut Johnson dalam Suhaenah Suparno (2001:27) kompetensi sebagai perbuatan rasional yang memuaskan untuk memenuhi tujuan dalam kondisi yang diinginkan. Kompetensi diartikan sebagai kecakapan yang memadai untuk melakukan suatu tugas atau sebagai suatu ketrampilan dan suatu kecakapan yang disyaratkan.

Kompetensi menurut Mulyasa (2006:36) adalah perpaduan dari pengetahuan, ketrampilan, nilai, dan sikap yang direfleksikan dalam kebiasaan berfikir dan bertindak. Dalam arti lain kompetensi dapat diartikan sebagai pengetahuan, ketrampilan dan kemampuan yang dikuasai oleh seseorang yang telah menjadi bagian dari dirinya sehingga ia dapat melakukan perilaku-perilaku kognitif, afektif dan psikomotor dengan sebaik-baiknya.

Menurut Wina Sanjaya (2006:68) dalam konteks pengembangan kurikulum, kompetensi adalah perpaduan dari pengetahuan, ketrampilan, nilai, dan sikap yang direfleksikan dalam kebiasaan berfikir dan bertindak. Seseorang yang memiliki kompetensi tertentu bukan hanya mengetahui, tetapi juga dapat memahami dan menghayati bidang tersebut yang tercermin dalam pola perilaku sehari-hari.

Dari definisi di atas kompetensi dapat diartikan sebagai kecakapan yang merupakan perpaduan dari pengetahuan, ketrampilan, nilai, dan sikap yang direfleksikan dalam bertindak dan berfikir sehingga ia dapat melakukan perilaku-perilaku kognitif, afektif dan psikomotor dengan sebaik-baiknya.

Kompetensi bukan hanya sekedar pemahaman akan materi pelajaran, akan tetapi bagaimana pemahaman dan penguasaan materi itu dapat mempengaruhi cara bertindak dan berperilaku dalam kehidupan sehari-hari termasuk perilaku-perilaku kognitif, afektif dan psikomotorik. Sebagaimana dikemukakan oleh Bloom dalam Nanang Hanafiah dan Cucu Suhana (2009:20-23) aspek kognitif, afektif dan psikomotor dapat dilihat sebagai berikut :

- 1) Aspek kognitif

Indikator aspek kognitif mencakup :

- a) Ingatan atau pengetahuan (*knowledge*), yaitu kemampuan mengingat bahan yang telah dipelajari

- b) Pemahaman (*comprehension*), yaitu kemampuan menangkap pengertian, menterjemahkan dan menafsirkan
- c) Penerapan (*application*), yaitu kemampuan menggunakan bahan yang telah dipelajari dalam situasi baru dan nyata
- d) Analisis (*analysis*), yaitu kemampuan menguraikan, mengidentifikasi dan mempersatukan bagian yang terpisah, menghubungkan antar bagian guna membangun suatu keseluruhan
- e) Sintesis (*synthesis*), yaitu kemampuan menyimpulkan, mempersatukan bagian yang terpisah guna membangun suatu keseluruhan, dan sebagainya
- f) Penilaian (*evaluation*), yaitu kemampuan mengkaji nilai atau harga sesuatu, seperti pernyataan atau laporan penelitian yang didasarkan suatu kriteria

2) Aspek afektif

Indikator aspek afektif mencakup:

- a) Penerimaan (*receiving*), yaitu kesediaan untuk menghadirkan dirinya untuk menerima atau memperhatikan pada suatu perangsang
- b) Penanggapan (*responding*), yaitu keturutsertaan, memberi reaksi, menunjukkan kesenangan memberi tanggapan secara sukarela

- c) Penghargaan (*valuing*), yaitu kepekatanggapan terhadap nilai atas suatu rangsangan, tanggung jawab, konsisten dan komitmen
- d) Pengorganisasian (*organization*), yaitu mengintegrasikan berbagai nilai yang berbeda, memecahkan konflik antar nilai, dan membangun sistem nilai, serta pengkonseptualisasian suatu nilai
- e) Pengkarakterisasian (*characterization*), yaitu proses afeksi dimana individu memiliki suatu sistem nilai sendiri yang mengendalikan perilakunya dalam waktu yang lama yang membentuk gaya hidupnya, hasil belajar ini berkaitan dengan pola umum penyesuaian diri secara personal, sosial dan emosional.

3) Aspek psikomotor

Indikator aspek psikomotor mencakup:

- a) Persepsi (*perception*), yaitu pemakaian alat-alat peras untuk membimbing efektifitas gerak
- b) Kesiapan (*set*), yaitu kesediaan untuk mengambil tindakan
- c) Respon terbimbing (*guide respons*), yaitu tahap awal belajar ketrampilan lebih kompleks, meliputi peniruan gerak yang dipertunjukkan kemudian mencoba dengan menggunakan tanggapan jamak dalam menangkap suatu gerak
- d) Mekanisme (*mechanism*), yaitu gerakan penampilan yang melukiskan proses dimana gerak yang telah dipelajari,

kemudian diterima dan diaopsi menjadi kebiasaan sehingga dapat ditampilkan dengan penuh percaya diri dan mahir

- e) Respons nyata kompleks (*complex over respons*), yaitu penampilan gerakan secara mahir dan cermat dalam bentuk gerakan yang rumit, aktivitas motorik berkadar tinggi
- f) Penyesuaian (*adaptation*), yaitu ketrampilan yang telah dikembangkan secara lebih baik sehingga tampak dapat mengolah gerakan dan menyesuaikan dengan tuntutan dan kondisi yang khusus dalam suasana yang lebih problematis
- g) Penciptaan (*origination*), yaitu penciptaan pola gerakan baru yang sesuai dengan situasi dan masalah tertentu sebagai kreatifitas.

2. kompetensi uji mikrobiologi penggunaan RT-PCR dan *Applied Biosystem Step One*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan proses penggandaan molekul DNA secara *in vitro*, sedangkan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah PCR kuantitatif (qPCR) dengan cara mendeteksi fluoresen yang dihasilkan selama reaksi PCR. Peningkatan sinyal fluoresen merupakan indikator amplifikasi/penggandaan produk PCR di setiap siklus PCR yang dapat diamati secara *real time*.

Jadi Real-Time PCR \approx PCR + Reagent Fluoresen + Sistem Detektor dan Software

Berikut adalah beberapa kelebihan teknik *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dibandingkan *Polymerase Chain Reaction* (PCR):

- a) lebih sensitif (limit deteksi lebih rendah);
- b) lebih spesifik (bila menggunakan probe);
- c) analisa secara kualitatif dan kuantitatif;
- d) tidak membutuhkan running elektroforesis; dan
- e) lebih cepat.

Terdapat beberapa komponen Reaksi *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah sebagai berikut.

- a) DNA Template: DNA yang mengandung sekuen target yang ingin dikopi atau diamplifikasi.
- b) DNA Polymerase: enzim yang disebut *Taq* Polymerase yang akan mensintesa komplemen DNA dari sekuen target.
- c) Primers: sekuen pendek DNA utas tunggal yang berkomplemen dengan bagian awal sekuen target yang akan diamplifikasi (dari kedua ujung 5' dan 3').
- d) Nucleotides: unit tunggal penyusun DNA berupa bases A, T, G and C, juga disebut dNTPs (*deoxynucleotides*).
- e) Larutan buffer berupa garam-garam dan metal yang dibutuhkan selama reaksi.
- f) Plus *Fluorescence Dye* (*Probe* atau *Nonprobe*).

- g) Plus *Fluorescence Detector System*.
- h) Plus Software untuk mengubah intensitas fluoresen menjadikuantitas hasil atau Ct.

a. Rotorgene

Rotorgene memiliki beberapa keunggulan dibandingkan system lainnya, keunggulan tersebut diantaranya adalah sebagai berikut:

- 1) sistem Rotary sehingga keseragaman suhu paling baik yaitu 0.01°C dibandingkan dengan system block yaitu $0.25\text{-}0.5^{\circ}\text{C}$;
- 2) tidak memerlukan ROX reference dye karena system pencahayaan yang simple sehingga tidak memerlukan lagi adjustment untuk pencahayaan, dibandingkan dengan system lain yang system pencahayaannya rumit;
- 3) tidak memerlukan kalibrasi yang sulit karena system pencahayaannya statis;
- 4) tidak memerlukan re-kalibrasi ketika dipindah tempatkan;
- 5) garansi untuk LED seumur hidup dibandingkan dengan brand lain yang menggunakan halogen lamp yang memiliki masa pakai; dan
- 6) memiliki channel untuk HRM (hardware dan software), dibandingkan dengan brand lain yang hanya memiliki HRM software.

b. Cara Kerja Rotorgene

Cara kerja dari Rotorgene adalah sebagai berikut.

- 1) Nyalakan Laptop

- 2) Nyalakan Rotor Gene
- 3) Persiapkan reaksi Real Time PCR sesuai dengan petunjuk kit.
- 4) Double Click icon Rotor-Gene Q Series Software 1.7.lnk

c. *Troubleshooting* Rotorgene

Troubleshooting Rotorgene terbagi menjadi 2 (dua) bagian yaitu pada bagian analisis dan instrumennya.

1) Analisis

a) Kesulitan *adjust threshold*

Adjust Threshold manual yang harus diperhatikan:

- Ntc
- Negatif kontrol
- Positif kontrol

b) Bentuk curva yang tidak baik/tidak biasa

Automatic : jika ada standard curve

- c) Sebab antara lain: pipetting error, tube terbuka, detector rusak
- d) NTC kontaminasi
- e) Reagent yang kurang baik

2) Instrumen

- a) Penyebabnya adalah permasalahan pada thermistor dalam chamber terlalu tinggi.
 - Hold pada 95°C - 10 min berarti masih berjalan baik

Cycle 1 : step : denaturation 95 °C - 10 sec berarti masih berjalan baik

Masuk step annealing 51 °C - 30 sec berarti Error

- Saran: *contact technical service*

b) Ketika running tube pecah

- Sebab: tidak pernah dikalibrasi, frekuensi running sample sering
- Kerusakan: pada thermistor heater

d. Prosedur Perawatan Rotorgene

Rotorgene memiliki prosedur tersendiri yang harus dilakukan dalam proses perawatannya yaitu adalah sebagai berikut.

- 1) Membersihkan lensa, lokasi di emisi dan deteksi dengan *cotton bud* yang diberi ethanol 70%.
- 2) Membersihkan lensa dilakukan setiap 1 bulan sekali tergantung dari penggunaan.
- 3) Bersihkan juga rotor chamber dengan ethanol 70% dengan cara di lap dengan tissue halus .
- 4) Untuk menghindari debu sebaiknya rotorgene ditutup bila tidak digunakan.
- 5) Untuk menghindari kontaminasi rotor chamber dibersihkan dengan 0.1% bleach, setelah itu dilap dengan PCR grade water menggunakan tissue halus.

e. Deteksi TSV dengan Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System

Langkah-langkah dalam membuat Master Mix TSV adalah sebagai berikut:

- 1)Thaw semua reagent
 - 2)Mix dengan baik menggunakan vorteks kecepatan rendah selama 5 detik.
 - 3)Spin dengan mini sentrifuge kecepatan 3000 rpm selama 30 detik
 - 4)Hitung jumlah master mix untuk setiap assay. Untuk reaksi run real-time PCR, ambil sejumlah yang diperlukan sesuai dengan konsentrasi final yang diinginkan. (lihat Tabel Contoh Menghitung Jumlah Reagent dari Working Solution).
- Konsentrasi run untuk primer per reaksi (final concentration) = 300 nM dalam 25 uL volume reaksi PCR
 - Konsentrasi run untuk probe per reaksi (final concentration) = 100 nM dalam 25 uL volume reaksi PCR

Tabel 1. Pemipetan

Komponen Reaksi	Volume (µL) / Reaksi	Konsentrasi Final	Volx reaksi
AgPath-ID One-Step RT-PCR – 25 X Enzyme Mix	1	1X	
AgPath-ID One-Step RT-PCR –	12.5	1X	

2X Buffer Mix			
Forward primer (7.5 μ M)	1	300 nM	
Reverse primer (7.5 μ M)	1	300 nM	
Probe (2.5 μ M)	1	100 nM	
Nuclease-free water	3.5	-	
Total vol master mix per reaksi	20	-	

1. Hitung berapa reaksi yang dibutuhkan dan kalikan dengan perhitungan per reaksi di atas.
2. Pipet 20 μ L ke dalam 48-well optical plate di well yang akan diisi dengan sampel dan kontrol.
3. Untuk sampel: tambahkan 5 μ L RNA hasil ekstraksi
4. Untuk kontrol negatif (NTC = no template control): tambahkan 5 μ L nuclease-free water
5. Bila ada kontrol positif: tambahkan 5 μ L RNA kontrol positif
6. Bila sudah, tutup plate dengan optical adhesive cover dan rapatkan.
7. Bila ada, sentrifuge plate untuk menurunkan semua cairan yang mungkin menempel di dinding tube dan menghilangkan gelembung udara bila ada.
8. Siapkan running.

C. Penelitian Yang Relevan

Tinjauan pustaka ini dimaksudkan untuk mengkaji hasil penelitian yang relevan dengan penelitian penulis dan menunjukkan pentingnya untuk

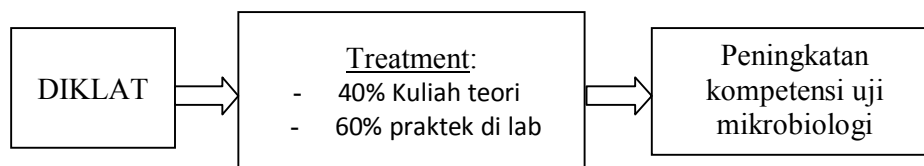
melakukan penelitian ini. Berikut merupakan penelitian terdahulu yang menurut peneliti relevan dengan penelitian yang akan dilakukan:

- Septi Dwi Dayanti (2011), dengan judul “ pengaruh model pembelajaran Cooperative Learning tipe Student team achievement division (STAD) pada pencapaian kompetensi membuat pola blazer di SMK N 1 Sewon bantu!” menyimpulkan bahwa : 1) pencapaian kompetensi membuat pola blazer kelas *non intervensi* sebagian besar berada pada kategori tuntas sebanyak 27 peserta didik (75%), sedangkan pada kelas *intervensi* kategori tuntas sebanyak 36 peserta didik (100%); 2) terdapat pengaruh tingkat pencapaian kompetensi dengan penggunaan model pembelajaran *cooperative learning* tipe STAD untuk pencapaian kompetensi membuat pola blazer antara kelas *intervensi* dan kelas *non intervensi* di SMK N 1 Sewon, hal ini ditunjukkan dari hasil rerata penilaian unjuk kerja yang diperoleh yaitu untuk kelas *intervensi* sebesar 8,16 sedangkan rata-rata 62 kelas *non intervensi* sebesar 7,66. Kemudian dibuktikan dengan hasil perhitungan uji t (*t-test*) diperoleh t hitung 3,334 > t tabel 2,000, maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan model pembelajaran *cooperative learning* tipe STAD efektif digunakan dalam pembelajaran membuat pola blazer pada kelas XI busana SMK N 1 Sewon; 3) pendapat peserta didik tentang penerapan model pembelajaran *cooperative learning* tipe STAD menunjukkan bahwa

pada kategori senang sebanyak 24 peserta didik (69,7%) dan pada kategori cukup senang sebanyak 12 peserta didik (33,3%).

D. Kerangka Berpikir

Dalam menyusun skripsi ini penulis membuat kerangka berpikir untuk memudahkan didalam penyusunan dan memudahkan bagi pembaca dan penyimak dalam memahami isinya. Dengan adanya pendidikan maka akan meningkatkan pengetahuan, dengan pelatihan akan meningkatkan keterampilan, dan dengan pengetahuan dan keterampilan akan dapat meningkatkan kompetensi uji mikrobiologi petugas laboratorium karantina ikan.



Gambar 1. Kerangka berpikir

E. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah adanya peningkatan kompetensi uji mikrobiologi petugas laboratorium karantina ikan di BKIPM setelah menjalani pendidikan dan pelatihan.

BAB. III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Pengolahan Data

Metode yang akan digunakan untuk mengolah data hasil kegiatan Pendidikan dan pelatihan Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi dengan Real Time PCR Rotorgene dan Step One ini terdiri dari metode Analisa Data Deskriptif dan Inferensi.

1. Analisa Data Deskriptif

Analisa data deskriptif yang digunakan untuk mengolah data hasil kegiatan Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One ini adalah rata-rata (*mean*).

Adapun rumusnya adalah sebagai berikut:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} ;$$

dengan:

\bar{x} : rata-rata (*mean*);

x_i : data ke-i; dan

n : jumlah data.

2. Analisa Data Inferensi

Analisa data inferensi yang digunakan untuk mengolah data hasil kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One adalah uji hipotesis memakai statistik uji *t-test* untuk data berpasangan. Berikut adalah langkah-langkah uji hipotesis menggunakan statistik uji *t-test*, dengan “d” adalah selisih sebelum dan sesudah diberikan perlakuan atau dapat ditulis “d = sebelum - sesudah”.

a. $H_0 : \mu_d = 0$ (tidak ada peningkatan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan)

$H_1 : \mu_d < 0$ (ada peningkatan sebelum dan sesudah diberikan perlakuan)

b. Tingkat signifikan alpha, $\alpha = 5 \%$ (tingkat kepercayaan 95%)

c. Statistik Uji:

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_d / \sqrt{n}};$$

dengan:

t : nilai statistik *t-test*

\bar{d} : rata-rata selisih sebelum - sesudah diberi perlakuan

μ_d : nilai yang akan di uji (biasanya nol)

s_d : standar deviasi selisih sebelum - sesudah diberi perlakuan

n : jumlah pasangan data

Statistik uji ini selain menggunakan nilai *t-test* bisa juga menggunakan nilai P (*p_value*) yang muncul pada output software statistika (MINITAB).

d. Daerah kritik:

H_0 ditolak jika nilai P (*p_value*) $< \alpha = 5\% = 0,05$ dan $t_{hitung}(\text{nilai mutlak}) > t_{tabel}$ dan berlaku sebaliknya H_0 ditolak jika $P > \alpha$ dan $t_{hitung} < t_{tabel}$.

e. Pengambilan Kesimpulan

Analisa uji hipotesis *t-test* ini memiliki asumsi bahwa data harus berdistribusi normal, sehingga sebelum melakukan analisa ini terlebih dahulu harus diuji kenormalan data. Langkah-langkah uji normalitas ini hampir mirip dengan uji hipotesis *t-test* diatas, yaitu dengan menggunakan nilai P (*p_value*) yang dihasilkan dari software statistika (MINITAB). Selanjutnya nilai tersebut dibandingkan dengan nilai alpha $\alpha = 5\%$ (jika tingkat kepercayaan yang diambil 95%). Jika nilai P (*p_value*) $< \alpha = 5\% = 0,05$ maka data tidak berdistribusi normal, sebaliknya jika nilai P (*p_value*) $> \alpha = 5\% = 0,05$ maka data berdistribusi normal. Kemudian selanjutnya dengan melihat perbandingan nilai t_{hitung} dan t_{tabel} , jika $t_{hitung} > t_{tabel}$ maka H_1 diterima.

B. Waktu dan Tempat

Kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* dilaksanakan di Hotel Orchardz Jalan Pangeran Jayakarta No.44 Jakarta. Adapun Laboratorium yang dijadikan tempat praktek dari kegiatan ini adalah Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM), Jalan Harapan I No.1A Setu Cilangkap, Jakarta Timur. Telp: (021) 8451378, 84599367, Fax : (021) 8448523. Pelaksanaan kegiatan tersebut tanggal 05-09 Desember 2011.

C. Populasi dan sampel

Populasi penelitian ini adalah peserta diklat Apresiasi peningkatan kompetensi uji mikrobiologi dengan RT-PCR Rotorgene dan Aplied petugas laboratorium di Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) sebanyak 22 orang. Adapun sampel penelitian adalah semua peserta diklat.

D. Instrument dan Teknik Pengumpulan Data

1. Instrument Penelitian

Instrument dalam penelitian ini berupa Soal Pretest dan Posttest yang masing-masing berjumlah 10 soal pilihan ganda. Adapun yang

membuat soal instrument adalah nara sumber dan instruktur yang telah ditunjuk oleh BKIPM.

2. Uji Instrument

Pengujian instrument dalam penelitian ini telah dilakukan oleh pakar ahli yang telah ditunjuk oleh BKIPM yang menguasai bidang yang diajarkan yaitu narasumber dan instruktur laboratorium. Peneliti dalam hal ini sebatas melakukan pengamatan dari pemberian *treatment* oleh pendidik terhadap peserta didik.

3. Teknik Pengumpulan Data

Teknik Pengumpulan data dalam penelitian ini menggunakan tiga cara yaitu:

a. Library research

Yaitu suatu teknik pengumpulan data dengan cara membaca buku-buku, referensi dan literature yang berhubungan dengan penyusunan laporan akhir

b. Observasi

Yaitu teknik pengumpulan data dengan mengadakan pengamatan-pengamatan secara langsung atau seksama pada pelaksanaan operasi perusahaan atau instansi, sejalan dengan judul diatas agar mendapatkan data yang objektif dan sistematis

c. Tes

Yaitu teknik pengumpulan data dengan memberikan memberikan daftar pertanyaan atau latihan atau alat lain yang digunakan untuk mengukur kecerdasan/pengetahuan, keterampilan, kemampuan, intelegensi, bakat, atau minat yang dimiliki oleh individu atau kelompok. Dalam hal ini tes yang digunakan adalah *Tes Prestasi (Achievement Test)*, yaitu tes yang digunakan untuk mengukur pencapaian seseorang setelah mempelajari sesuatu.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

A. Hasil Penelitian

Kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* secara resmi dibuka oleh Kepala Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan, Ir. Asep Dadang Koswara, M.Si. Kemudian dilanjutkan oleh para narasumber yang memberikan pengajaran atau penjelasan tentang materi apresiasi ini. Metode pengajaran yang digunakan oleh para narasumber dalam apresiasi ini terbagi menjadi dua metode yaitu sebagai berikut:

1. kuliah teori (40%) di ruang rapat; dan
2. praktek langsung (60%) di laboratorium.

Hasil dari kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* ini dilihat dari perbandingan antara nilai pretest dan posttest para peserta, yang tidak lain merupakan tingkat pengetahuan dan kemampuan (kompetensi) para peserta. Nilai tersebut merupakan perbandingan nilai sebelum dan sesudah mengikuti kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One*. Tabel 2. di bawah ini menyajikan daftar nilai pretest dan posttest para peserta diklat tersebut.

Tabel 2. Nilai pretest dan posttest peserta diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One*

NO	NAMA PESERTA	PRETEST	POSTEST
1	Inda Wahyuni, S.St.Pi	7	8
2	Iwan Supriadi, SP.	5	6
3	Sri Luky Nila Murni, S.Si, MP.	5	8
4	Eko Soeprianto, A.Pi.	4	7
5	Ulfah S. Kuba, S.Pi	5	7
6	Sari Utami Hidayati, S.Pi.	7	9
7	Sigit H. Irawan Purnomo	8	9
8	Wahyu Nurlita, A.Md.	8	8
9	Mohamad Fathoni, A.Md.	8	8
10	Dedy Arief Hendriyanto, S.St.Pi, M.Si.	6	8
11	Oscar Daniel Butar-Butar, S.Pi.	3	3
12	Raflina herman, A.Pi.	4	9
13	drh. Riyanto	6	9
14	Noviana Dewi, S.Pi.	6	8
15	Sumini, A.Md.	8	7
16	Rila Prabekti, A.Md.	-	10
17	Erniwati, S.Pi	-	-
18	Dolly Novella Rawung, S.St.Pi.	4	8
19	Laili Rohmah, A.Md.	7	7
20	Wiwit Supriyono, S.Pi.	4	8

21	Dini Oktaviani, S.Pi.	6	10
22	Ishaaq Saputra, S.St.Pi	9	6
RATA RATA		6	7,76

B. Pembahasan

1. Analisa Data Deskriptif

Tabel 2. Di atas memperlihatkan dengan jelas bahwa jumlah peserta yang mengikuti diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* adalah 22 (dua puluh dua) peserta. Selain itu terlihat juga nilai rata-rata pretest dan posttest para peserta apresiasi (dengan rentang nilai 1-10), yaitu nilai rata-rata pretest sebesar 6 yang lebih rendah dari nilai posttest yang diperoleh yaitu 7,76. Ini berarti terjadi peningkatan nilai rata-rata peserta apresiasi dari sebelum dan sesudah mengikuti kegiatan apresiasi. Berikut adalah table representasi data Pretest dan Posttest dari Peserta Diklat:

Tabel 3. Representasi Hasil Pretest dan posttest.

Data	Pretest	posttest
nilai tertinggi	9	10
nilai terendah	3	3
nilai rata-rata	6	7,76

2. Analisa Data Inferensi

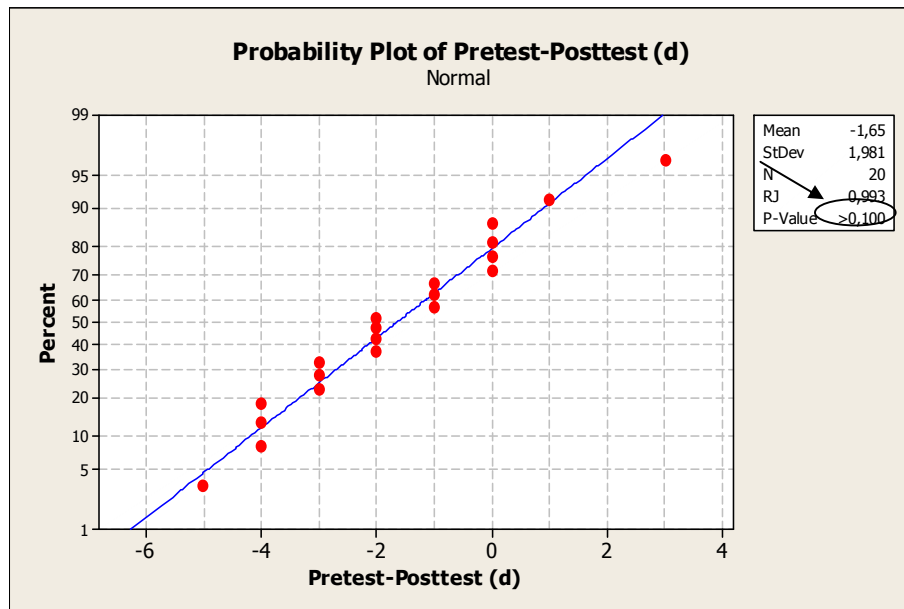
Analisa data deskriptif di atas, mengarah pada terjadinya peningkatan nilai rata-rata peserta diklat dari sebelum dan sesudah mengikuti kegiatan diklat. Maka dari itu akan dilihat apakah tingkat pengetahuan dan kemampuan peserta meningkat setelah mengikuti kegiatan diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One*.

Terlebih dahulu ditentukan hipotesis nol yaitu bahwa tidak ada peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta setelah mengikuti kegiatan diklat, dan hipotesis alternatifnya adalah ada peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta setelah mengikuti kegiatan diklat tersebut. Kedua hipotesis tersebut akan dilakukan uji hipotesis dengan tingkat kepercayaan 95%. Adapun statistik uji yang digunakan adalah statistik uji t (*t-test*) untuk data berpasangan.

Data hasil pretest dan posttest pada tabel 2. di atas terdapat beberapa data yang *missing* (kosong tidak ada datanya). Uji Hipotesis *t-test* data berpasangan mensyaratkan data yang diuji harus lengkap berpasangan dan tidak boleh ada data yang *missing*, sehingga beberapa data yang *missing* tersebut tidak akan diikutsertakan dalam analisa. Meskipun demikian langkah ini tidak akan mengurangi keabsahan dalam penarikan kesimpulan.

Sebelum uji hipotesis *t-test* dilakukan, terlebih dahulu di uji kenormalan data (asumsi data harus berdistribusi normal) sebagai

prasyarat yang harus dipenuhi sebelum masuk ke tahap uji hipotesis *t-test*. Untuk mempermudah dalam proses perhitungan analisisnya, digunakan software statistika MINITAB.



Gambar 2. Grafik *Probability Normalitas Pretest – Posttest (d)*

Gambar 2. di atas merupakan hasil analisa uji normalitas dengan menggunakan statistic uji Ryan –Joiner (Shapiro-Wilk) yang ada pada Software MINITAB. Adapun nilai *P_value* (ditunjuk oleh anak panah) yang dihasilkan adalah “> 0,100” yang juga “> 0,05 (nilai alpha)”. Itu artinya bahwa dengan tingkat kepercayaan 95%, data tersebut berdistribusi normal.

Langkah selanjutnya adalah uji hipotesis *t-test*, yaitu sebagai berikut.

- a. $H_0 : \mu_d = 0$ (tidak ada peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta antara sebelum dan sesudah mengikuti diklat)

$H_1 : \mu_d < 0$ (ada peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta antara sebelum dan sesudah mengikuti diklat)

- b. Tingkat signifikan alpha, $\alpha = 5 \%$ (tingkat kepercayaan 95%)
- c. Statistik Uji :

One-Sample T: Pretest-Posttest (d)							
Test of mu = 0 vs < 0							
					Upper		
Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	Bound	T	P
Pretest-Posttest	20	-1,65000	1,98083	0,44293	-0,88412	-3,73	0,001

Gambar 3. Uji Hipotesis Pretest – Posttest

- d. Menentukan t tabel

Tabel distribusi t dicari pada $\alpha = 5\% : 2 = 2,5\%$ (uji 2 sisi) dengan derajat kebebasan (df) $n-1$ atau $20-1 = 19$. Dengan pengujian 2 sisi (signifikansi = 0,025) hasil diperoleh untuk t tabel sebesar 2,093 (Lihat pada lampiran) atau dapat dicari di Ms Excel dengan cara pada cell kosong ketik =tinv(0.05,19) lalu enter.

- e. Daerah kritik:

- Berdasarkan tingkat signifikan α :

H_0 ditolak jika nilai $P < \alpha = 0.05$

- Berdasarkan perbandingan t hitung dan t table :

H_0 ditolak jika t hitung $>$ t tabel

- f. Pengambilan Kesimpulan :

Karena nilai $P < \alpha$ ($0.001 < 0.05$), dan nilai t hitung(nilai mutlak) $>$ t tabel ($3,73 > 2,093$) maka H_0 ditolak artinya bahwa ada peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta antara sebelum

dan sesudah mengikuti diklat. Berdasarkan kesimpulan pada uji hipotesis *t-test* di atas, dapat dikatakan bahwa dengan tingkat kepercayaan 95% ada atau terjadi peningkatan pengetahuan dan kemampuan peserta antara sebelum dan sesudah mengikuti diklat. Sebagai catatan bahwa nilai negative pada *t* hitung di atas menunjukkan bahwa rata-rata nilai pretest lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata nilai posttest.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. DIKLAT pada BKIPMKHP dilaksanakan dengan dua metode yaitu 40% kuliah teori dan 60% praktek langsung di laboratorium.
2. Berdasarkan pembahasan dari uji hipotesis *t-test* terlihat bahwa dengan kepercayaan 95% tingkat pengetahuan dan kemampuan (kompetensi) peserta setelah menjalani DIKLAT meningkat secara signifikan, yang ditunjukkan dengan nilai $P < \alpha$ ($0.001 < 0.05$) dan $t \text{ hitung} > t \text{ tabel}$ ($3,73 > 2,093$).

B. Saran

1. Diharapkan metode pengujian yang telah diajarkan pada Apresiasi Peningkatan kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan *Applied Biosystem Step One* ini dapat diterapkan dalam pengujian sehari-hari.
2. Kegiatan diklat Apresiasi ini sangat menunjang sekali dalam meningkatkan pengetahuan dan kemampuan petugas karantina ikan, pengendalian mutu dan keamanan hasil perikanan sehingga perlu diadakan kegiatan yang sama secara berkelanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar Prabu Mangkunegara. (2007). *Perencanaan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia*. Bandung: PT. Refika Aditama.
- A.W. Wijaya. (1990). *Administrasi Kepegawaian Suatu Pengantar*. Edisi II. Cetakan 2. Jakarta: CV Rajawali Pers.
- Desiliyarni Temmy. _____. *Pengantar Teknik Amplifikasi dengan Real Time PCR System*. PT. Laborindo Sarana
- Kania Wini. _____. *Rotorgene. Solutions for Life Science and Biotechnology*. PT. GeneCraft Labs
- Kustiman. (2004) *Sumber Daya Manusia Dalam Era Globalisasi*. Jakarta: Benderless comparison.
- Mutiara S. panggabean (2004). *Manajemen Sumber Daya Manusia*. Bogor: Ghalia. Indonesia.
- Nanang Hanafiah dan Cucu Suhana. 2010. *Konsep Strategi Pembelajaran*. Jakarta : Refika Aditama
- Pengertian Kompetensi Guru Majalah Pendidikan (www.majalahpendidikan.com) diakses pada 10 Januari 2013
- Septi Dwi Dayanti (2011), dengan judul “ pengaruh model pembelajaran Cooperative Learning tipe Student team achievement division (STAD) pada pencapaian kompetensi membuat pola blazer di SMK N 1 Sewon bantul”
- Soekidjo Notoatmodjo. (1992). *Pengembangan Sumber Daya Manusia*. cetakan kelima Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Soeroto. (1986). *Strategi Pembangunan dan Perencanaan Tenaga Kerja*. Yogyakarta: Gadjah Mada Press.
- Sondang P. Siagian. (1992). *Manajemen Sumber Daya Manusia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Suhaenah Suparno, 2001. *Membangun Kompetensi Belajar*. Yogyakarta : Departemen Pendidikan Nasional.
- Wibisono, Y. (2005). *Metode Statistika*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wina Sanjaya. 2009. *Strategi Pembelajaran Berorientasi Standar Proses Pendidikan*. Jakarta: Kencana Prenada Media Group.
- Zulaela, Gunardi, Rakhman, A., Utami, H. (2003). *Modul Praktikum Metode Statistika*. Yogyakarta : Program Studi Statistika UGM.
- _____, _____. *SOP StepOne Software*. (IQREAL - qPCR/qRT-PCR). PT. King Lab Indonesia
- _____, (2011). Laporan Tahunan Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. Jakarta.

LAMPIRAN 1.

Daftar Peserta Diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene dan Biosystem Step One

**Lampiran Peserta Apresiasi Penggunaan Real Time PCR Rotorgene
dan Applied Biosystem Step One
Tanggal 05-09 Desember 2011**

No.	Instansi	Jumlah Peserta
1.	Pusat Karantina Ikan	2
2.	Balai Besar KIPM Jakarta I	2
3.	Balai Besar KIPM Makassar	1
4.	BUSKIPM	3
5.	Balai KIPM Kelas I Denpasar	1
6.	Balai KIPM Kelas I Surabaya I	1
7.	Balai KIPM Kelas I Medan I	1
8.	Balai KIPM Kelas I Balikpapan	1
9.	Balai KIPM Kelas I Jakarta II	2
10.	Balai KIPM Kelas I Surabaya II	1
11.	Balai KIPM Kelas II Mataram	1
12.	Balai KIPM Kelas II Manado	1
13.	Balai KIPM Kelas II Semarang	1
14.	Balai KIPM Kelas II Banjarmasin	1
15.	Stasiun KIPM Kelas II Merak	1
Total Peserta		20

LAMPIRAN 2.

Soal Pretest dan Posttest

Nama :
Asal UPT :

Pretest Apresiasi Kompetensi Uji Mikrobiologi
RT-PCR "Rotorgene" dan "Step One"
BUSKIPM - 2011

1. Teknik yang digunakan untuk memonitor reaksi PCR secara real time adalah
 - a. PCR Konvensional
 - b. Real Time PCR
 - c. PCR Assay
 - d. PCR Tagman
2. Real Time PCR dapat digunakan untuk mengukur
 - a. Template secara kuantitas
 - b. Perbandingan sensitifitas dari primer
 - c. Perbedaan gene (allelic)
 - d. Betul semua
3. Real time PCR dalam pendeteksianya dapat menggunakan Probe dan SYBR Green. Keuntungan menggunakan SYBR Green adalah kecuali :
 - a. Tidak bisa multipleks
 - b. Design mudah
 - c. Lebih murah dibandingkan real-time dengan menggunakan bahan kimia lainnya
 - d. Dapat digunakan untuk menganalisa atau membandingkan sensitifitas dan efisiensi dari sepasang primer
4. Berikut adalah kelebihan Real Time PCR dibandingkan dengan PCR konvensional kecuali :
 - a. Sensitifitas dan spesifitas yang lebih tinggi
 - b. Tidak ada proses lagi setelah amplifikasi DNA
 - c. Bisa multipleks sampai 6 probe
 - d. Biaya lebih murah
5. Dibawah ini adalah kekurangan Real Time PCR kecuali :
 - a. Protokol yang sederhana
 - b. Diperlukan training khusus

- c. Standardisasi/verifikasi lebih sulit dan membutuhkan waktu yang lama
 - d. Chemistri and platform sangat bervariasi
6. Pemeriksaan dengan metoda PCR bertujuan untuk :
- a. Meningkatkan jumlah sel organism target
 - b. Meningkatkan jumlah copy DNA target agar dapat divisualisasikan
 - c. Pembelahan sel organism target
 - d. Merubah DNA menjadi protein
7. Yang termasuk dalam golongan virus-virus RNA adalah :
- a. TSV, VNN, YHV, BP
 - b. VNN, TSV, IMNV, YHV
 - c. IHHNV, TSV, IMNV, BP
 - d. VNN, YHV, WSSV, TSV
8. Faktor yang mempengaruhi kualitas desain primer diantaranya adalah :
- a. Faktor homologi
 - b. Kandungan GC
 - c. Perbedaan suhu annealing antar primer
 - d. Semua betul
9. Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam preparasi mastermix untuk RT-PCR adalah kecuali :
- a. NTC
 - b. Kontrol positif
 - c. Primer dan template
 - d. buffer
10. Perbedaan antara PCR konvensional dan Real time adalah :
- a. PCR konvensional hasilnya kualitatif, Real time hasilnya kuantitatif
 - b. PCR Konvensional prosesnya lama, Real time prosesnya cepat
 - c. PCR konvensional memerlukan tenaga ahli, Real time tidak memerlukan tenaga ahli
 - d. Semua betul

Nama :
Asal UPT :

Pretest Apresiasi Kompetensi Uji Mikrobiologi
RT-PCR "Rotorgene" dan "Step One"
BUSKIPM - 2011

1. Real time PCR dalam pendeteksianya dapat menggunakan Probe dan SYBR Green. Keuntungan menggunakan SYBR Green adalah kecuali :
 - e. Dapat digunakan untuk menganalisa atau membandingkan sensitifitas dan efisiensi dari sepasang primer
 - f. Lebih murah dibandingkan real-time dengan menggunakan bahan kimia lainnya
 - g. Tidak bisa multipleks
 - h. Design mudah
2. Perbedaan antara PCR konvensional dan Real time adalah :
 - e. PCR konvensional memerlukan tenaga ahli, Real time tidak memerlukan tenaga ahli
 - f. PCR konvensional hasilnya kualitatif, Real time hasilnya kuantitatif
 - g. PCR Konvensional prosesnya lama, Real time prosesnya cepat
 - h. Semua betul
3. Faktor yang mempengaruhi kualitas desain primer diantaranya adalah :
 - e. Perbedaan suhu annealing antar primer
 - f. Faktor homologi
 - g. Kandungan GC
 - h. Semua betul
4. Real Time PCR dapat digunakan untuk mengukur
 - a. Perbandingan sensitifitas dari primer
 - b. Template secara kuantitas
 - c. Perbedaan gene (allelic)
 - d. Betul semua
5. Dibawah ini adalah kekurangan Real Time PCR kecuali :
 - e. Standardisasi/verifikasi lebih sulit dan membutuhkan waktu yang lama
 - f. Kimia and platform sangat bervariasi
 - g. Diperlukan training khusus

- h. Protokol yang sederhana
6. Berikut adalah kelebihan Real Time PCR dibandingkan dengan PCR konvensional kecuali :
- e. Biaya lebih murah
 - f. Tidak ada proses lagi setelah amplifikasi DNA
 - g. Bisa multipleks sampai 6 probe
 - h. Sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi
7. Yang termasuk dalam golongan virus-virus RNA adalah :
- e. VNN, YHV, WSSV, TSV
 - f. TSV, VNN, YHV, BP
 - g. IHHNV, TSV, IMNV, BP
 - h. VNN, TSV, IMNV, YHV
8. Pemeriksaan dengan metoda PCR bertujuan untuk :
- e. Meningkatkan jumlah copy DNA target agar dapat divisualisasikan
 - f. Meningkatkan jumlah sel organism target
 - g. Pembelahan sel organism target
 - h. Merubah DNA menjadi protein
9. Teknik yang digunakan untuk memonitor reaksi PCR secara real time adalah
- e. PCR Tagman
 - f. PCR Konvensional
 - g. PCR Assay
 - h. Real Time PCR
10. Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam preparasi mastermix untuk RT-PCR adalah kecuali :
- e. Dna Ladder
 - f. Kontrol positif
 - g. NTC
 - h. Primer dan template

LAMPIRAN 3.

Kunci Jawaban Soal Pretest dan Posttest

Kunci Jawaban Soal

Kunci Jawaban Soal Pretest:

1. B
2. D
3. A
4. D
5. A
6. B
7. B
8. D
9. D
10. D

Kunci Jawaban Soal Posttest :

1. C
2. D
3. D
4. D
5. D
6. A
7. D
8. A
9. D
10. A

LAMPIRAN 4.

Hasil Pretest dan Posttest

HASIL TES PESERTA
APRESIASI KOMPETENSI UJI MIKROBIOLOGI
RT-PCR "ROTORGENE" DAN "STEP ONE"
HOTEL ORCHARDZ, 5 - 9 DESEMBER 2011

NO	NAMA	INSTANSI	PRETEST	POSTEST
1	Inda Wahyuni, S.St.Pi	Pusat karantina Ikan	7	8
2	Iwan Supriadi, SP.	Pusat karantina Ikan	5	6
3	Sri Luky Nila Murni, S.Si, MP.	Balai Besar KIPM Jakarta I	5	8
4	Eko Soeprianto, A.Pi.	Balai Besar KIPM Jakarta I	4	7
5	Ulfah S. Kuba, S.Pi	Balai Besar KIPM Makassar	5	7
6	Sani Utami Hidayati, S.Pi.	BUSKIPM	7	9
7	Sigit H. Irawan Purnomo	BUSKIPM	8	9
8	Wahyu Nurlita, A.Md.	Balai KIPM Kelas I Denpasar	8	8
9	Mohamad Fathoni, A.Md.	Balai KIPM Kelas I Surabaya I	8	8
10	Dedy Arief Hendriyanto, S.St.Pi, M.Si.	Balai KIPM Kelas I Medan I	6	8
11	Oscar Daniel Butar-Butar, S.Pi.	Balai KIPM Kelas I Medan I	3	3
12	Rafina herman, A.Pi.	Balai KIPM Kelas I Balikpapan	4	9
13	drh. Riyanto	Balai KIPM Kelas I Jakarta II	6	9
14	Noviana Dewi, S.Pi.	Balai KIPM Kelas I Jakarta II	6	8
15	Sumini, A. Md.	Balai KIPM Kelas I Surabaya II	8	7
16	Rila Prabekti, A.Md.	Balai KIPM Kelas II Mataram		10
17	Erniwati, S.Pi	Balai KIPM Kelas II Mataram		
18	Dolly Novella Rawung, S.St.Pi.	Balai KIPM Kelas II Manado	4	8
19	Laili Rohmah, A.Md.	Balai KIPM Kelas II Semarang	7	7
20	Wiwit Supriyono, S.Pi.	Balai KIPM Kelas II Banjarmasin	4	8
21	Dini Oktaviani, S.Pi.	Stasiun KIPM Kelas I Lampung	6	10
22	Ishaq Saputra, S.St.Pi	Stasiun KIPM Kelas II Merak	9	6
		Rata-rata	6	7.76190476

LAMPIRAN 5.

t tabel statistic

t Table

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.25}$	$t_{.20}$	$t_{.15}$	$t_{.10}$	$t_{.05}$	$t_{.025}$	$t_{.01}$	$t_{.005}$	$t_{.001}$	$t_{.0005}$
one-tail	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
two-tails	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.378	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.478	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.908	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.898	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.893	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.889	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.887	1.093	1.372	1.812	2.228	2.784	3.189	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.878	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.680	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	0.000	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
1000	0.000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300
Z	0.000	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291
	0%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
	Confidence Level										

LAMPIRAN 6.

Jadwal Kegiatan Diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uji Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One

**JADWAL PELAKSANAAN APRESIASI PENINGKATAN KOMPETENSI UJI MIKROBIOLOGI PENGGUNAAN RT PCR
HOTEL ORCHARDZ, 5 - 9 DESEMBER 2011**

HARI /TANGGAL	MATERI	PEMBICARA	INSTRUKTUR	LOKASI
Senin 5 Desember 2011				
12.00 - 14.00	Check in dan Registrasi	Panitia		Hotel
14.00 - 14.45	Pembukaan	Kepala BUSKIPM		
14.45 – 15.15	Pengantar Apresiasi	Kepala BUSKIPM		
15.15 - 15.30	Rehat			
15.30 - 17.00	Teori RT PCR	PT. Genecraftlab (Inggriani Listiawan, M.Biomed)		
Selasa 6 Desember 2011				
07.30 - 09.00	Perjalanan ke BUSKIPM			BUSKPM
09.00 - 10.30	Pengenalan Alat, Perawatan, Troubleshooting, Analisa Data Rotorgene	PT. Genecraftlab (Inggriani Listiawan, M.Biomed)		
10.30 - 10.45	Rehat			
10.45 - 12.15	Pengantar Praktek Ekstraksi dan Preparasi mastermix	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)		
12.15 - 13.30	Ishoma			
13.30 - 15.00	Pengantar Praktek Menggunakan IQ REAL KIT pada	PT. King Lab		

	Penggunaan Alat RT-PCR “ROTORGENE”	(Dennis Teoh Han Pin)		
15.00 - 15.15	Rehat			
15.15 - 16.45	Praktek Ekstraksi Menggunakan SILICA GEL	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
Rabu 7 Desember 2011				
07.30 - 09.00	Perjalanan Ke BUSKIPM			BUSKIPM
09.00 - 10.30	Praktek Ekstraksi Menggunakan DTAB-CTAB	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Pengenalan Alat RT-PCR Step One Pengantar Amplifikasi	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
10.30 - 10.45	Rehat			
10.45 - 12.15	Persiapan MasterMix dan running sampel	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Pengantar Ekstraksi	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
12.15 - 13.30	Ishoma			
13.30 – 15.00	Lanjutan Running sampel	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Praktek Ekstraksi Persiapan MasterMix degan Taqman Probe	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
15.00 – 15.15	Rehat			
15.15 – 16.45	Analisa Data	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Pembuatan sampel <i>sheet</i> dan <i>Running</i>	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	

	Analisa Data			
Kamis 8 Desember 2011				
07.30 - 09.00	Perjalanan ke BUSKIPM			BUSKIPM
09.00 - 10.30	<i>Trouble Shooting</i> Hasil Praktek	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Analisa data Praktek I <i>Trouble Shooting</i> Hasil Praktek Persiapan <i>MasterMix</i>	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
10.30 - 10.45	Rehat			
10.45 - 12.15	<i>Lanjutan Trouble Shooting</i>	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)	Siti Rahmawati	
	Sampel sheet dan Running II Latihan Instal dan Penggunaan <i>Software</i>	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
12.15 - 13.30	Ishoma			
13.30 - 15.00	Diskusi	PT. King Lab (Dennis Teoh Han Pin)		
	Analisa Data Praktek II Diskusi	PT. Laborindo Sarana	Dita Rustanti	
15.00 - 15.15	Rehat			
Jumat 9 Desember 2011				
09.00 – 09.30	Post Test	Panitia		Hotel

09.30 – 09.45	Rehat			
09.45 - selesai	Penutupan	Kepala BUSKIPM		

LAMPIRAN 7.

Materi Diklat Apresiasi Peningkatan Kompetensi Uj Mikrobiologi Real Time PCR Rotorgene dan Step One



Pengantar Teknik Amplifikasi dengan Real-Time PCR System

Ir. Temmy Desilijarni, MSi

PT. Laborindo Sarana

Jl. Arteri Raya Pondok Indah No.8A Jakarta 12240
Tel. 7225036, 7255165. Fax. 7257226
temmy@laborindo.com, temmyde11@yahoo.com

PCR vs Real-Time PCR

- **PCR** : Polymerase Chain Reaction = penggandaan molekul DNA secara *in vitro*.
- **Real-Time PCR** : adalah PCR kuantitatif (qPCR) dengan cara mendeteksi fluoresen yang dihasilkan selama reaksi PCR. Peningkatan sinyal fluoresen merupakan indikator amplifikasi/penggandaan produk PCR di setiap siklus PCR yang dapat diamati secara real time.
- **Jadi Real-Time PCR** \approx PCR + Reagent Fluoresen + Sistem Detektor dan Software

PT. Laborindo Sarana/TD/09

2

Komponen Reaksi Real-Time PCR

- **DNA Template** - DNA yang mengandung sekuen target yang ingin dikopi/ diamplifikasi.
- **DNA Polymerase** – enzim yang disebut *Taq* Polymerase yang akan mensintesa komplemen DNA dari sekuen target
- **Primers** – sekuen pendek DNA utas tunggal yang berkomplemen dengan bagian awal sekuen target yang akan diamplifikasi (dari kedua ujung 5' dan 3').
- **Nucleotides** – unit tunggal penyusun DNA berupa bases A, T, G and C, juga disebut dNTPs (deoxynucleotides)
- **Larutan buffer** berupa garam-garam dan metal yang dibutuhkan selama reaksi.
- Plus **Fluorescence Dye** (Probe atau Nonprobe)
- Plus **Fluorescence Detector System**
- Plus **Software** untuk mengubah intensitas fluoresen menjadi kuantitas hasil atau Ct

PT. Laborindo Sarana/TD/09

3

Kelebihan Teknik Real-Time PCR dibandingkan PCR

- Lebih sensitif (limit deteksi lebih rendah)
- Lebih spesifik (bila menggunakan probe)
- Analisa secara kualitatif dan kuantitatif
- Tidak membutuhkan running elektroforesis
- Lebih cepat

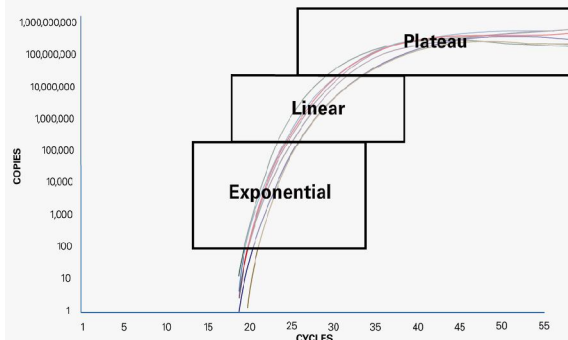
PT. Laborindo Sarana/TD/09

4

Proses Amplifikasi Real-Time PCR

With Real-Time PCR, there are three amplification stages:

1) Exponential, 2) Linear, and 3) Plateau.



Exponential:

- Penggandaan produk scr tepat
- Reaksi sangat presisi dan spesifik.

Linear:

- Komponen reaksi menjadi terbatas
- Efisiensi reaksi menurun.

Plateau:

- Reaksi telah berhenti
- Tidak ada lagi penambahan produk PCR

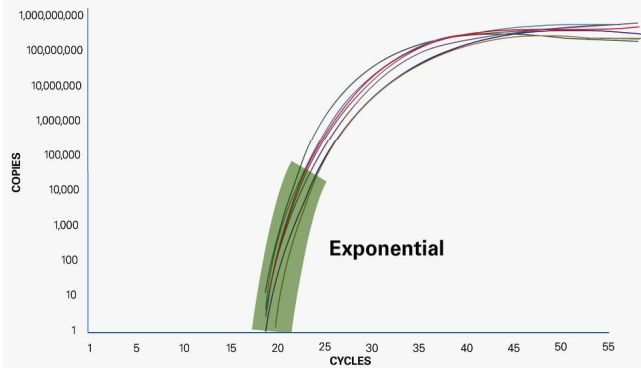
PT. Laborindo Sarana/TD/09

5

PT. Laborindo Sarana/TD/09

6

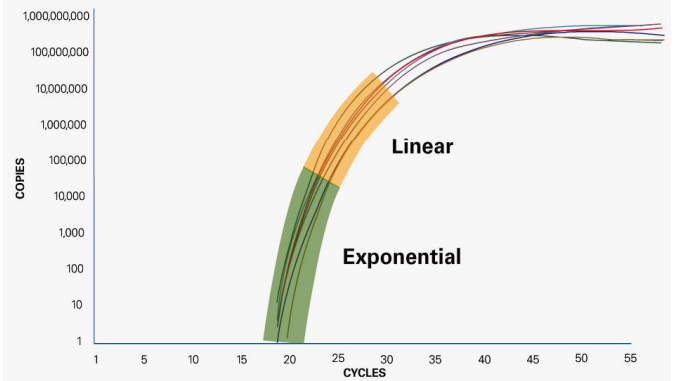
In the Exponential phase, the reagents are in abundance and the PCR product doubles every cycle.



PT. Laborindo Sarana/TD/09

7

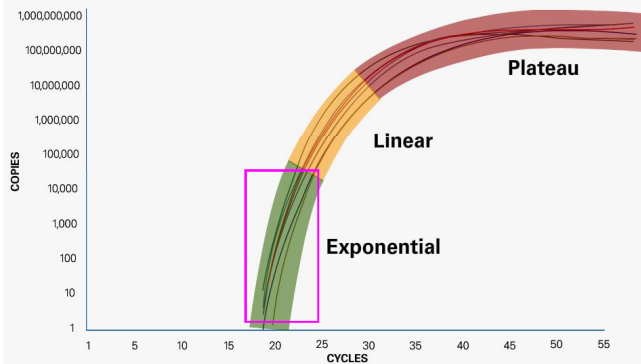
In the Linear phase, the reagents begin to run out. The PCR reaction slows down.



PT. Laborindo Sarana/TD/09

8

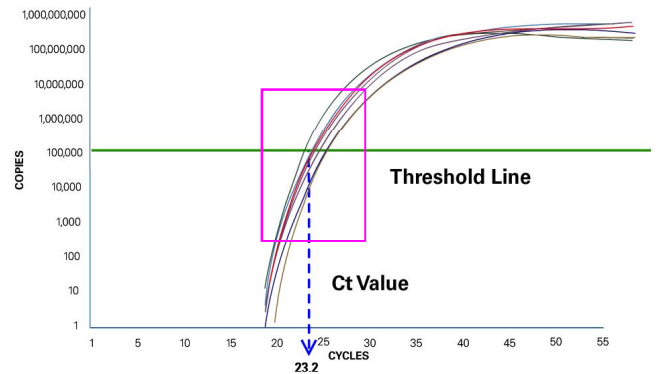
In the Plateau phase, the reagents are depleted and the PCR reaction stops.



PT. Laborindo Sarana/TD/09

9

The PCR cycle at which the sample reaches this level is called the **Cycle Threshold, Ct**. The Ct value is used in downstream quantitation or presence/absence detection.



PT. Laborindo Sarana/TD/09

10

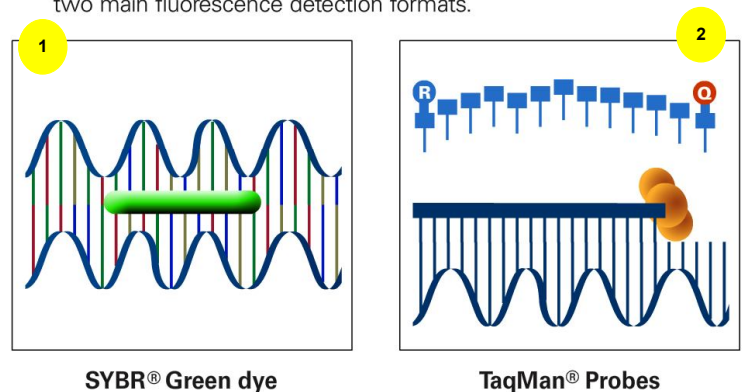
Bagan Deteksi Real-Time PCR

1. Label Fluoresen : **SYBR Green** atau **TaqMan Probe** (5' nuclease assay)
2. Sistem Detektor : **Precision Optics**
- +
3. Multicomponenting Algorithm **SDS software**
- =
- Resolusi **Dye Superior**

PT. Laborindo Sarana/TD/09

11

Real-Time PCR systems from Applied Biosystems use two main fluorescence detection formats.



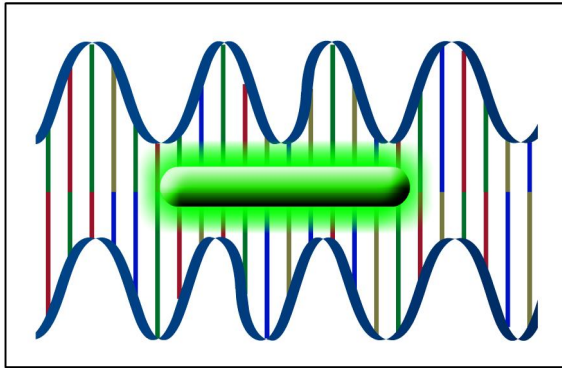
PT. Laborindo Sarana/TD/09

12

The DNA-dye complex emits green light, which is recorded by the Real-Time PCR instrument.

1

Prinsip :
Ketika SYBR Green ditambahkan pada reaksi PCR, akan berikatan secara non-spesifik dengan setiap DNA utas ganda.

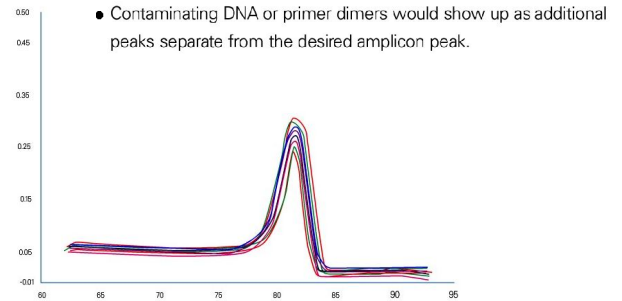


SYBR® Green dye

PT. Laborindo Sarana/TD/09

13

For SYBR® Green detection, it is important to run a Melting Curve analysis following the Real-Time PCR to ensure that the desired amplicon was detected. The inflection point on the curve indicates the melting point of the amplicon.



Positive Amplicon Detection

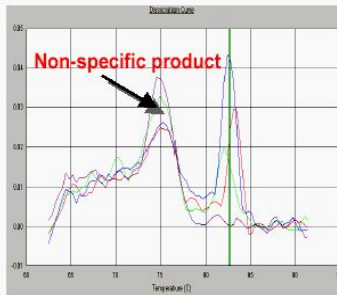
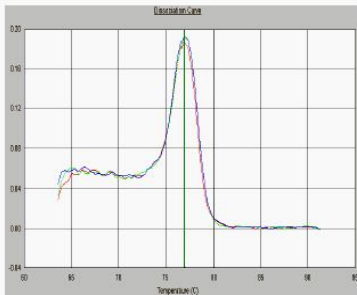
PT. Laborindo Sarana/TD/09

14

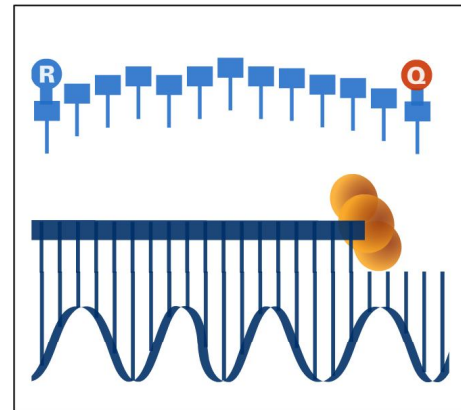
SYBR® Green I Dye Dissociation Curve

Sample with Specific Product

Sample with non-specific Product



2



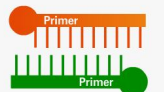
TaqMan® Probes

PT. Laborindo Sarana/TD/09

16

The TaqMan® Probe fluorescence format uses:

Two primers



A probe with a fluorescent Reporter dye and a Quencher



Target DNA



Polymerase



TaqMan® Probes

PT. Laborindo Sarana/TD/09

17

The design of the probe is key. The TaqMan® probe is an oligonucleotide that contains a fluorescent reporter dye bound to the 5' end and a quencher on the 3' end.

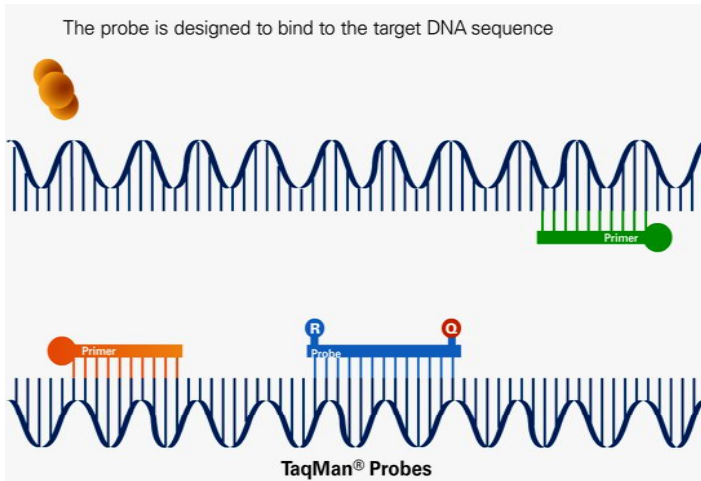
A probe with a fluorescent Reporter dye and a Quencher



TaqMan® Probes

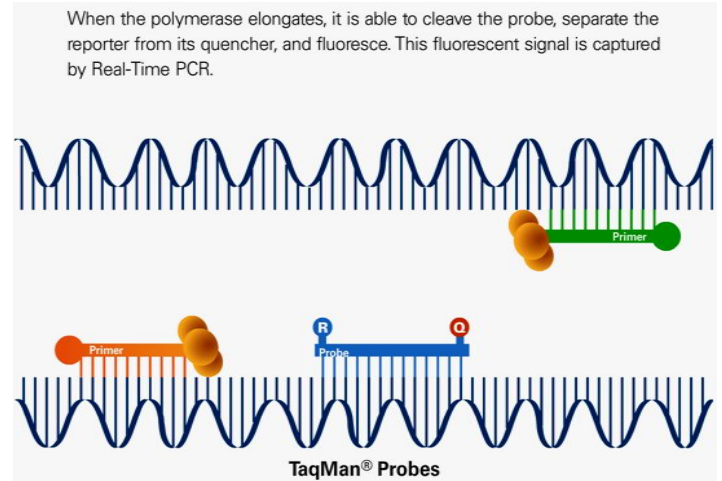
PT. Laborindo Sarana/TD/09

18



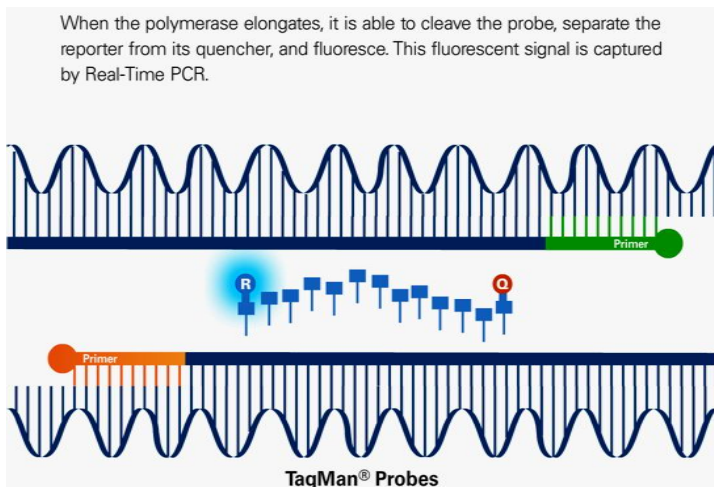
PT. Laborindo Sarana/TD/09

19



PT. Laborindo Sarana/TD/09

20



PT. Laborindo Sarana/TD/09

21

SOFTWARES

1. [Sequence Detection Software](#) Version 2.x (7300, 7500 7900, StepOne/StepOnePlus for AQ, RQ, AD, +/-) dan untuk running dan analisa data.

User friendly termasuk :

- **Wizards** untuk Plate set-up untuk easy experimental design,
- Real-time monitoring,
- Auto-baseline dan auto-threshold untuk memudahkan analisa data
- Analisa beberapa kurva standard secara simultan pada single plate
- Automated SNP genotyping calling, simple dissociation curve data collection and viewing

2. Primer and probe design menggunakan [Primer Express®](#) software

PT. Laborindo Sarana/TD/09

22

Absolute Quantification

Determines the **absolute quantity** of a single nucleic acid target sequence within an unknown sample. This technique requires a set of standard nucleic acid. Quantity calculated by extrapolating from the standard curve.

Relative Quantification

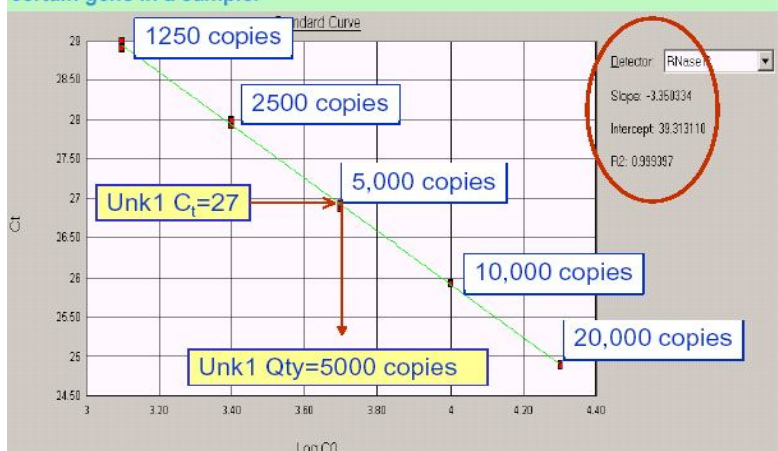
Determines the **change in expression** of a nucleic acid sequence target in a test sample **relative** to the same sequence in a **calibrator** sample, without the use of standard curve.

PT. Laborindo Sarana/TD/09

23

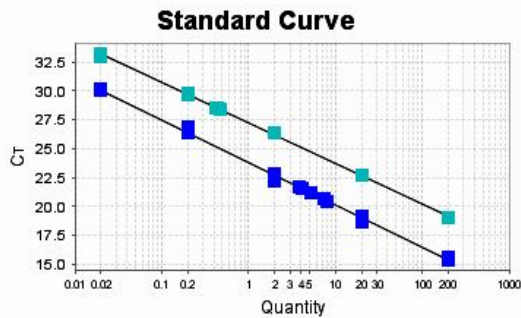
Absolute Standards

■ Goal is to quantify an exact copy number (or number of molecules) of a certain gene in a sample.

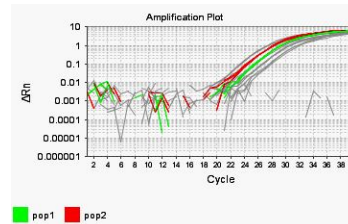


Log C0

Multiple Standard Curve (AQ)



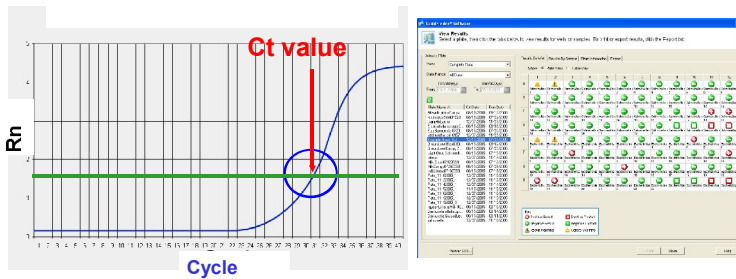
25



Absolute Quantification

#	Well	Sample Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
1	A1	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
2	A2	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
3	A3	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
4	A4	pop1	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.281	28.261	0.02	2,772.365	2,807.509	34.422
5	A5	pop1	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.242	28.261	0.02	2,841.162	2,807.509	34.422
6	A6	pop1	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.260	28.261	0.02	2,808.998	2,807.509	34.422
7	A7	pop2	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.241	27.2	0.036	5,308.388	5,446.654	121.319
8	A8	pop2	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.186	27.2	0.036	5,496.287	5,446.654	121.319
9	A9	pop2	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.174	27.2	0.036	5,535.287	5,446.654	121.319
10	A10	STANDARD	FAM-TAMRA	26.389	26.282	0.094	10,000			
11	A11	STANDARD	FAM-TAMRA	26.213	26.282	0.094	10,000			
12	A12	STANDARD	FAM-TAMRA	26.243	26.282	0.094	10,000			
13	B1	STANDARD	FAM-TAMRA	27.368	27.278	0.083	5,000			
14	B2	STANDARD	FAM-TAMRA	27.259	27.278	0.083	5,000			
15	B3	STANDARD	FAM-TAMRA	27.207	27.278	0.083	5,000			
16	B4	STANDARD	FAM-TAMRA	28.325	28.434	0.226	2,500			
17	B5	STANDARD	FAM-TAMRA	28.281	28.434	0.226	2,500			
18	B6	STANDARD	FAM-TAMRA	28.696	28.434	0.226	2,500			
19	B7	STANDARD	FAM-TAMRA	29.649	29.539	0.114	1,250			
20	B8	STANDARD	FAM-TAMRA	29.546	29.539	0.114	1,250			

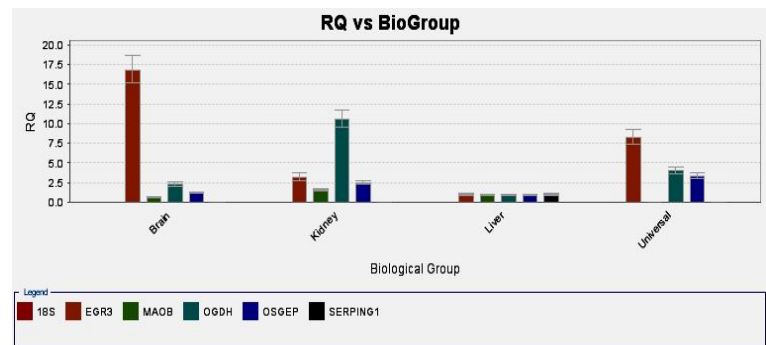
Qualitative Analysis



PT. Laborindo Sarana/TD/09

27

RQ - Ekspresi Gen



PT. Laborindo Sarana/TD/09

28

Plus/Minus Assay with IPC

Menentukan sekuen target spesifik berupa **ada (plus)** or **tidak ada (minus)** pada sampel dengan menggunakan internal positive control (IPC) untuk memonitor proses PCR dan untuk menjamin bahwa hasil negatif tidak karena kegagalan PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
B	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
C	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
D	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
E	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
F	IPC	IPC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10

Allelic Discrimination - SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms)



AACCTGCATAATGCCAG



AACCTGCAGAAATGCCAG

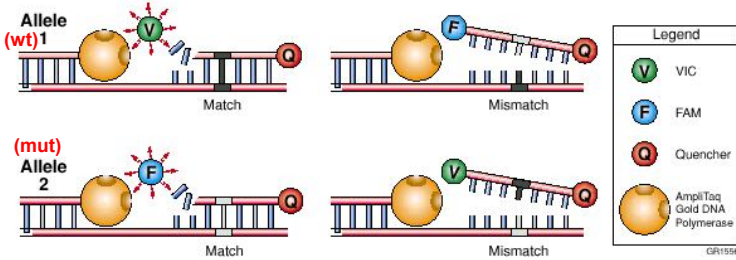
- Genotypic difference can results in protein modification and could lead to disease or other undesirable trait.

PT. Laborindo Sarana/TD/09

30

5' Nuclease SNP Assays

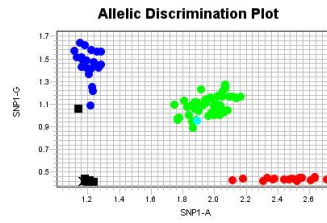
Using more than 1 primer/probe per reaction to detect for variant from single nucleotide sequence.



- SNP is located in the middle of probe
- Quencher; TAMRA or MGB/NFQ*

PT. Laborindo Sarana/TD/09

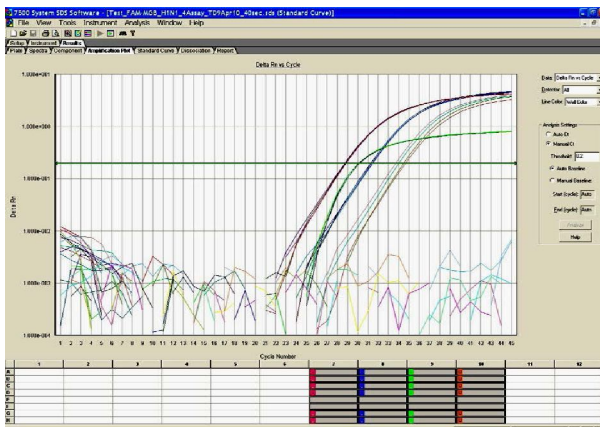
31



Deteksi SNP (Mutasi Titik)

[illegible]

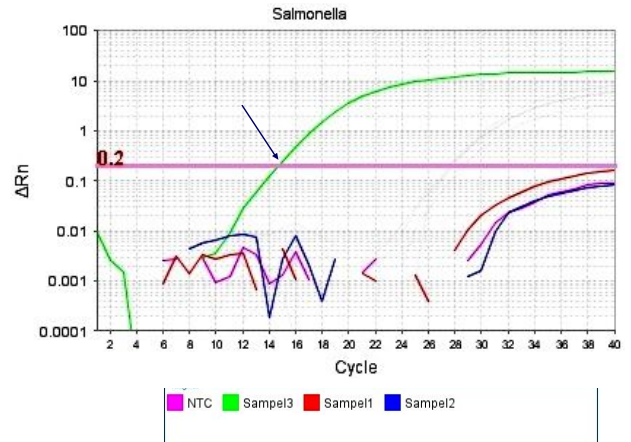
Pathogen Detection: Swine Flu dan AIV – A/H5/N1/H7



PT. Laborindo Sarana/TD/09

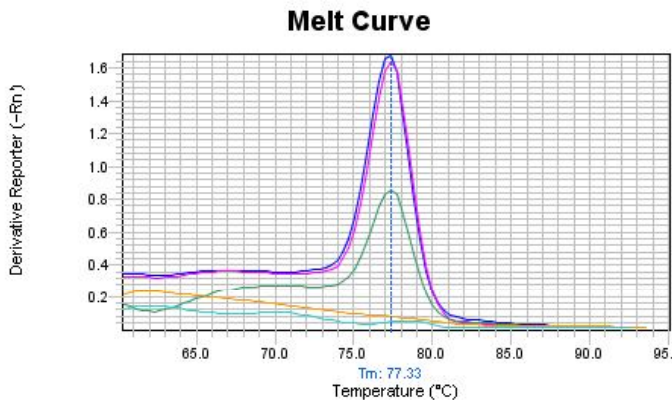
33

Pathogen Detection example: Salmonella

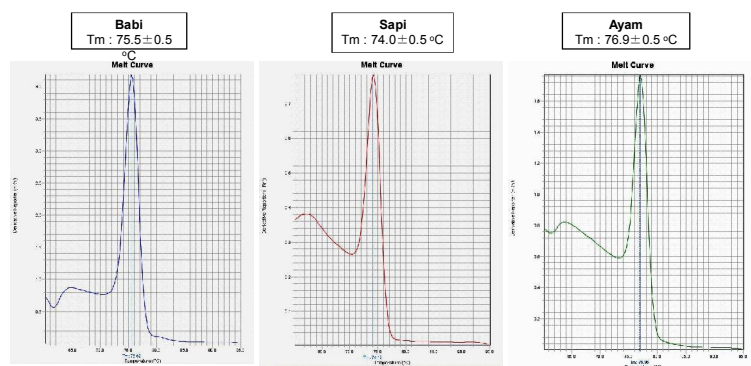


34

Pork Detection (halal food)



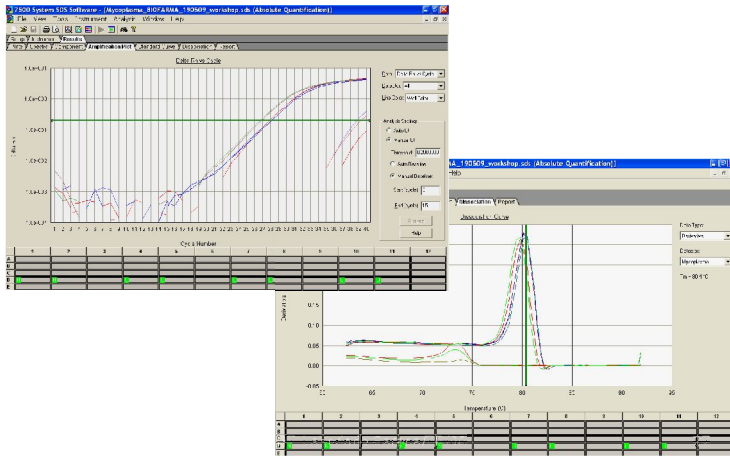
Species ID – Fast Run



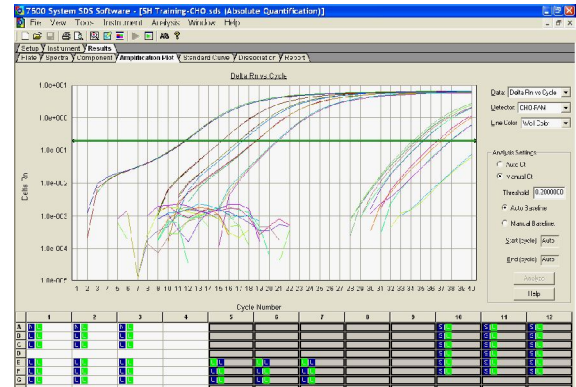
PT. Laborindo Sarana/TD/09

36

90 sp. Mycoplasma Detection



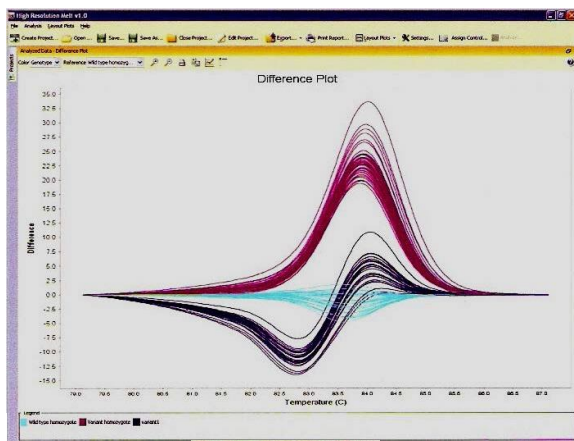
CHO DNA Quantification



PT. Laborindo Sarana/TD/09

38

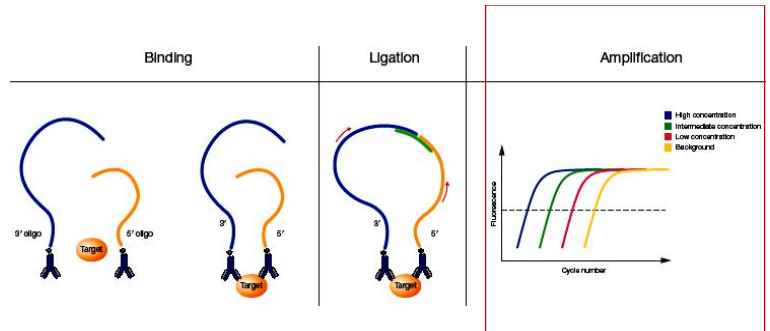
High Resolution Melting - SNP



PT. Laborindo Sarana/TD/09

39

Protein Expression Assay



PT. Laborindo Sarana/TD/09

40

Kuantifikasi Mutlak (AQ) VS Kuantifikasi Relatif (RQ)

PT Kinglab Indonesia
(5-9th december 2011)

Kuantifikasi Mutlak (Absolute Quantification, AQ)

“Dilakukan dengan perbandingan (Ekstrapolasi) nilai C_T sampel pada Kurva Standar PCR”

Kapan dipakai?

- Doktor ingin tahu kuantitas virus HIV per ml sampel darah pesakit (komformasi penyakit HIV)
- konfirmasi kromosomal DNA
- Kuantitas copy target gen (virus/bakteri) dalam volume spesifik.

Kuantifikasi Mutlak (Absolute Quantification, AQ)

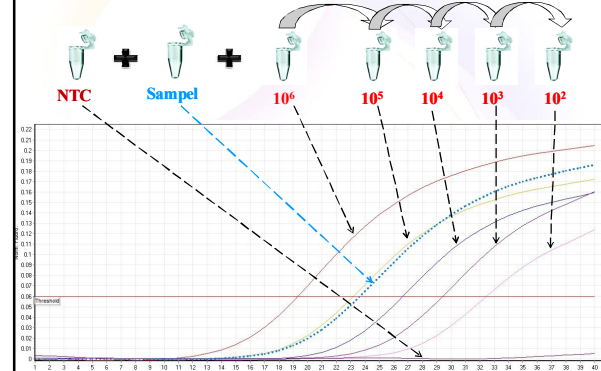
Kebutuhan:

- Konsentrasi positif standar diketahui (contoh 10^6 copies/ul)

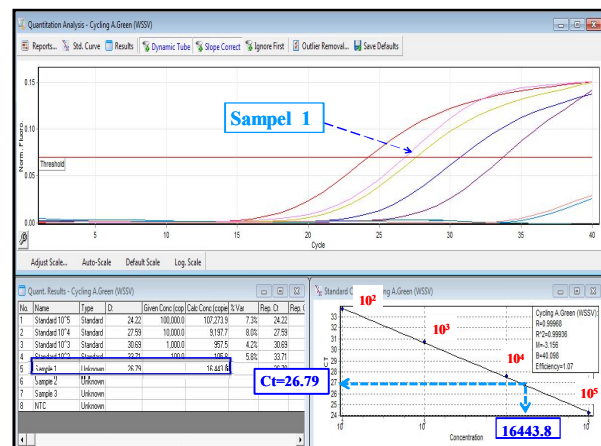
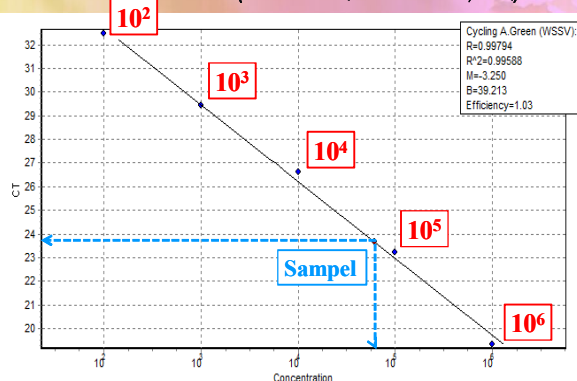
Langkah terlibat:

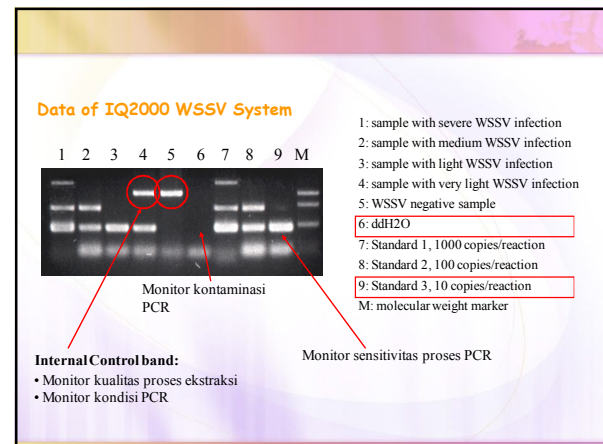
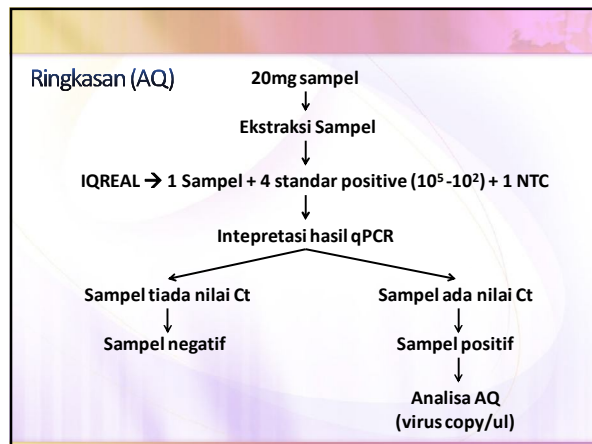
- Sediakan seri pengenceran standar positif dari stock solusi (10^6)
- 5 standar positif dengan konsentrasi 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 (untuk menghasilkan kurva standar)
- Jalan proses PCR pada sampel unknown dan 4 standar positif.
- Analisa kurva standar (plot nilai C_t vs logaritma kuantitas copy bagi 5 standar positif)
- Nilai C_t sampel diekstrapolasi pada kurva standar untuk mencari kuantitas copy (sampel)

Kuantifikasi Mutlak (Absolute Quantification, AQ)



Kuantifikasi Mutlak (Absolute Quantification, AQ)





Kuantifikasi Relatif (Relative Quantification, RQ)

"Tahap ekspresi gen ditentukan (dihitung) secara relatif dengan sampel kalibrasi (atau dinamai Calibrator)"

Kapan RQ dipakai?

- Doktor ingin tahu tahap ekspresi virus HIV dalam darah pesakit (setelah pengobatan)
- penelitian perbedaan sel kanker dengan sel normal
- Tahap infeksi WSSV dalam sel udang

Kuantifikasi Relatif (Relative Quantification, RQ)

Kebutuhan:

- PCR desain untuk deteksi DNA virus
- PCR desain untuk deteksi DNA udang (Internal Control)
- Standar positif kontrol yang diketahui konsentrasi asal (konsentrasi DNA virus dan konsentrasi DNA udang - dipakai sebagai kalibrator)

Langkah terlibat:

- Sediakan satu standar positif yang diketahui konsentrasi asal (10^4 copies DNA wssv + 10^4 copies DNA udang)
- lakukan PCR pada sampel dengan satu standar positif (10^4)
- Setelah butuh nilai Ct pada sampel dan Standar positif, langsung ke penghitungan formula $\Delta\Delta Ct$

Kuantifikasi Relatif (Relative Quantification, RQ)

$Ct_{S(FAM)}$	Nilai Ct FAM sampel
$Ct_{S(VIC)}$	Nilai Ct VIC sampel
$Ct_{0(FAM)}$	Nilai Ct FAM kalibrator (10^4 copies)
$Ct_{0(VIC)}$	Nilai Ct VIC kalibrator (10^4 copies)
ΔCt	Perbedaan nilai Ct FAM dengan VIC
$\Delta\Delta Ct$	Perbedaan ΔCt_0 dengan ΔCt_s

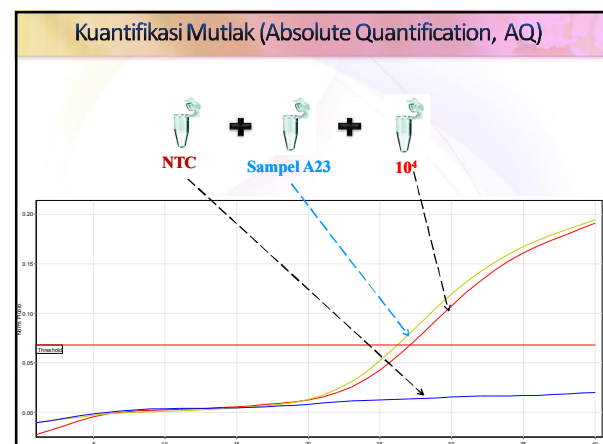
Formula Kuantifikasi Relatif:

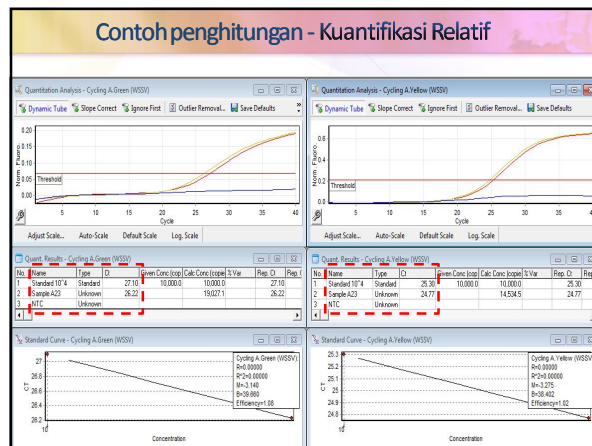
STEP 1 -- $\Delta Ct_0 = Ct_{0(FAM)} - Ct_{0(VIC)}$

STEP 2 -- $\Delta Ct_s = Ct_{s(FAM)} - Ct_{s(VIC)}$

STEP 3 -- $\Delta\Delta Ct_s = \Delta Ct_0 - \Delta Ct_s$

STEP 4 -- $Q_{RQ} = 2^{\Delta\Delta Ct_s} \times 10,000 \text{ copy}/10,000 \text{ sel}$





Kuantifikasi Relatif (Relative Quantification, RQ)

Sampel	Ct FAM (wssv)	Ct VIC (IC)
Standar 10 ⁴ (Kalibrator)	27.10	25.30
Sampel A23 (unknown)	26.22	24.77

Penghitungan:

STEP 1 -- $\Delta Ct_0 = Ct_{0(FAM)} - Ct_{0(VIC)} = 27.10 - 25.30 = 1.80$

STEP 2 -- $\Delta Ct_5 = Ct_{5(FAM)} - Ct_{5(VIC)} = 26.22 - 24.77 = 1.45$

STEP 3 -- $\Delta\Delta Ct_5 = \Delta Ct_0 - \Delta Ct_5 = 1.80 - 1.45 = 0.35$

STEP 4 -- $Q_{RQ} = 2^{\Delta\Delta Ct_5} \times 10,000 \text{ copy} / 10,000 \text{ sel}$
 $= 2^{0.35} \times 10000 \text{ copy} / 10000 \text{ sel}$
 $= 1.275 \times 10000 \text{ viral copy} / 10000 \text{ sel udang}$

Sampel A23 ada 12,750 copy wssv di 10,000 sel udang

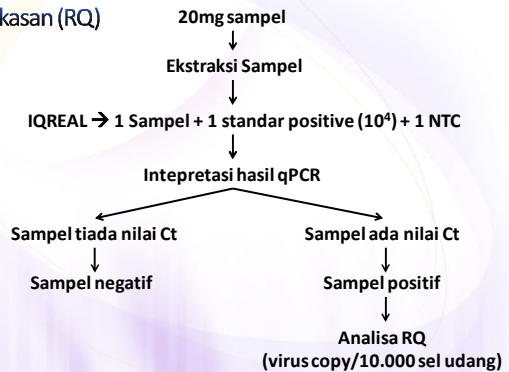
Kuantifikasi Relatif (Relative Quantification, RQ)

Sampel 4 mengandung 12,750 copy wssv di 10,000 sel udang

Kapan kita tahu situasi samada WSSV pada fase tersembunyi (latent phase) atau pada fase reproduksi (reproductive phase)?

➤ Daripada data pengujian, di kasus WSSV, semasa nisbah VIRUS/SEL UDANG melebihi 1 dalam 400 (atau 25 dalam 10000), virus kemungkinan besar sedang mengahala ke siklus reproduksi (menghasilkan lebih banyak virus → virus outbreak)

Ringkasan (RQ)



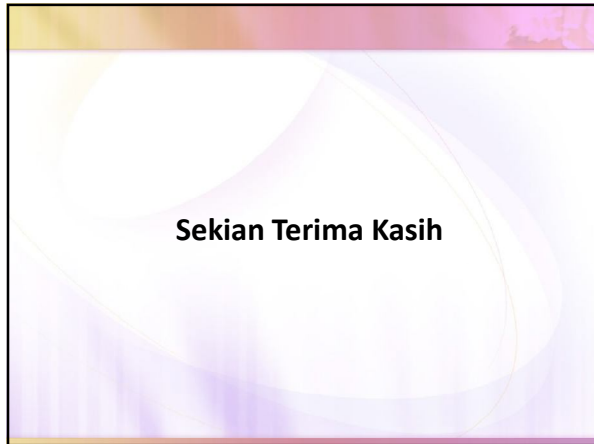
Kuantifikasi Mutlak (AQ) VS Kuantifikasi Relatif (RQ)

	AQ	RQ
Unit	Virus copies / ul sampel	Virus copies / 10 ⁴ sel udang
Mengukur dari	Kurva kalibrasi	$\Delta\Delta Ct$
Jenis sampel	Semua jenis matriks	Udang sahaja
Sampel pada beda pengenceran	Hasil PCR beda	Hasil PCR sama
Standar	4 standar (10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²)	1 standar (10 ⁴)
Maksud	Kuantitas templat	Tingkat infeksi

Kuantifikasi Relatif (Rotorgene)

Please find the step by step calculation using rotorgene below:

- open the data
- select 'Analysis'
- in the analysis tab, select 'Quantitation'
- gv your curve threshold (import curve or auto-threshold) - Do for both FAM (virus) and Vic (IC)
- in analysis tab again, select 'delta-delta CT relative quantitation'
- select 'new analysis', name it if u want, click ok
- appear 4 box to tick
- click validation run performed, then click yes
- click gene of interest quantitation, select FAM of the virus u Ina analysed(eg. WSSV FAM)
- click normaliser quantitation, select VIC of the virus u Ina analysed(eg. WSSV VIC)
- click calibrator define, select standard 10⁴ of the virus(eg. WSSV)
- a table will come out. the column relative concentration is the ratio, use the positive sample ration X 10,000 is equal to ?copy virus / 10,000 cells.

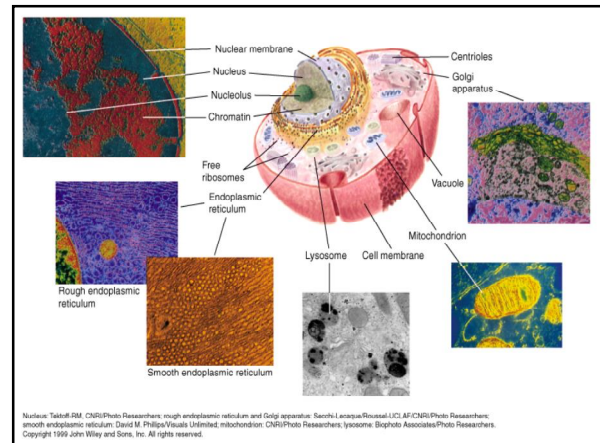
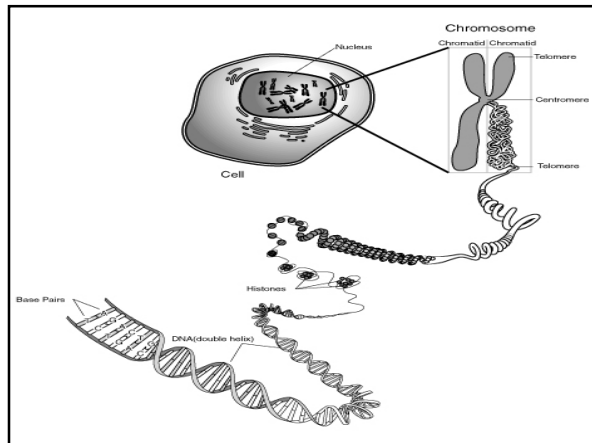


Purifikasi & Analisa Total Asam Nukleat

PT Kinglab Indonesia
(5-9th december 2011)

Apa itu purifikasi sampel?

- ✓ Metode isolasi/memisahkan bahan genetik/asam nukleat (DNA/RNA) daripada sampel.



Metode Purifikasi:

- ❖ Spin Colume, membrane filter...
- ❖ Solvent based extraction – Lysis, RNA Extraction solution, CTAB-DTAB, TRIzol, DNAzol.....
- ❖ Salt based extraction
- ❖ Magnetic Beads – Silica BOOM, TACO machine, Qiagen BioRobot...

Kategori kepada 3 Jenis:

1. Total DNA Ekstraksi
2. Total RNA Ekstraksi
3. Total Asam Nukleat Ekstraksi (DNA+RNA serentak)

Perbedaan performance

	LYSIS	CTAB-DTAB	SILICA	TACO mesin
Solvent	Tiada	Chloroform	Tiada	Tiada
Recovery DNA	Bagus	Sangat Bagus	Sangat Bagus	Sangat Bagus
Kualitas DNA	Bagus	Sangat bagus	Sangat bagus	Sangat bagus
Kebutuhan waktu	40minet	1jam30minet	1jam	50minet (by mesin)
Kelebihan	Cocok kuantitas sampel yang banyak dan rutin	Cocok untuk sampel yang "kotor"	Ekstraksi DNA & RNA serentak. Cocok kuantitas sampel yang banyak dan rutin	Ekstraksi DNA & RNA serentak. Cocok kuantitas sampel yang banyak dan rutin

SILICA Ekstraksi Kit

SILICA Ekstraksi Kit:

	Kondisi simpan	200 reaksi
SILICA	Suhu ruang	8ml, 1g/ml
GT Buffer	Suhu ruang	280ml/botol
DEPC ddH2O	4°C	200ml/botol

SILICA particle

➤ Bahan yang mempunyai ciri-ciri menempel DNA dan RNA dalam buffer yang butuh kondisi tertentu : pH rendah, kekuatan ionik tinggi, kehadiran "Chaotropic salt".

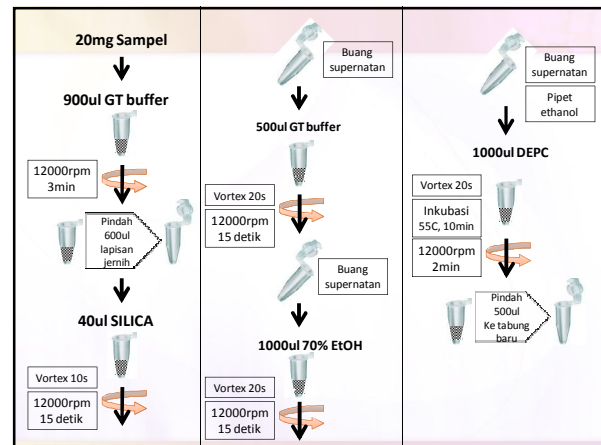
GT Buffer

➤ Mengandung GuSCN (Guanidium Thiocyanate) dan EDTA

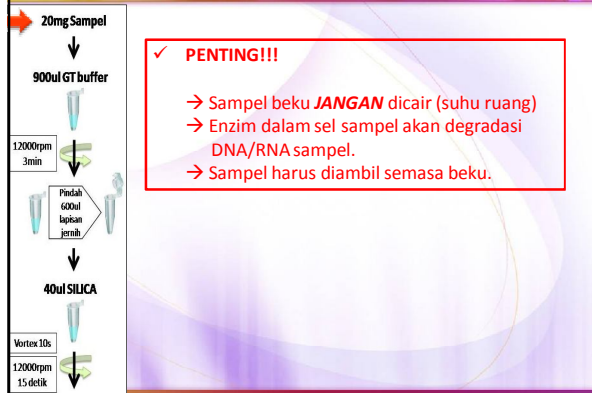
Metode SILICA Ekstraksi :

Metode yang sangat digemari oleh industri biology molekular karena beberapa faktor berikut:

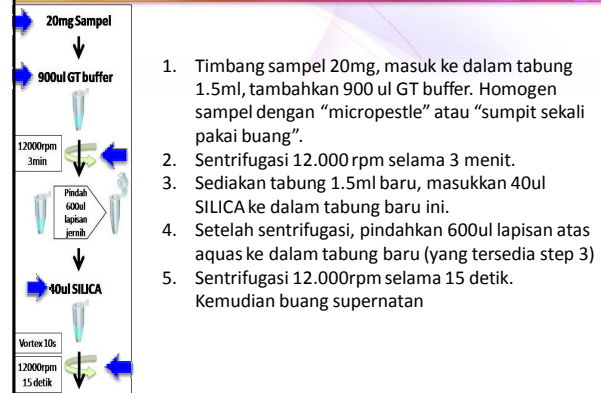
- Ekstraksi DNA dan RNA serentak.
- Proses ekstraksi tidak diperlukan pelarut organik (chloroform) yang beracun dan bahaya.
- Hasil ekstraksi banyak dan kualitas tinggi
- Cara kerja yang mudah, user friendly dan efisien.



Cara Kerja (SILICA) - 1



Cara Kerja (SILICA) - 2



Cara Kerja (SILICA) - 3

20mg Sampel
↓
900ul GT buffer
↓
12000rpm 3min
↓
Pindah 600ul lapisan jernih
↓
40ul SILICA
↓
Vortex 10s
↓
12000rpm 15 detik

❖ **GT buffer**
 → Rasio sampel (100ul/20mg): GT buffer (900ul)
 → menyediakan kondisi yang sesuai untuk SILICA menempel dengan DNA/RNA.
 → GuSCN (Guanidium Thiocyanate) dan EDTA menghalang aktivitas enzim DNase dan RNase.

Covalent Bridge

Cara Kerja (SILICA) - 4

Buang supernatan
↓
500ul GT buffer
↓
Vortex 20s
↓
12000rpm 15 detik
↓
Buang supernatan
↓
1000ul 70% EtOH
↓
Vortex 20s
↓
12000rpm 15 detik

6. Masukkan 500ul GT buffer untuk cuci pellet SILICA. Vortex pellet sampai larut sepenuhnya (bisa pecahkan pellet dengan tip pipet)
7. Sentrifugasi 12.000rpm selama 15 detik. Buang supernatan.
8. Tambah 1000 ul 70% ethanol untuk cuci pellet SILICA. Vortex pellet SILICA sampai larut sepenuhnya (bisa pecahkan pellet dengan tip pipet)
9. Sentrifugasi 12.000rpm selama 15 detik. Buang supernatan. Pipet buangkan 70% ethanol yang berlebihan.

Cara Kerja (SILICA) - 5

Buang supernatan
Pipet ethanol
↓
1000ul DEPC
↓
Vortex 20s
↓
Inkubasi 55C, 10min
↓
12000rpm 2min
↓
Pindah 500ul ke tabung baru

10. Tambah 1000 ul DEPC ddH2O untuk larutkan pellet SILICA. Vortex pellet SILICA sampai larut sepenuhnya. Inkubasi pada 55 C selama 10 menit. vortex dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit.
11. Pindahkan 500ul supernatan ke tabung 1.5ml baru. DNA siap sedia untuk aplikasi selanjutnya.

❖ **Proses sentrifugasi**
 → sentrifugasi pada step 5, 7 & 9 JANGAN melebihi 20 detik, karena akan membentuk pellet SILICA yang susah dipecah/dilarut pada step kemudian.

❖ **Proses pencucian**
 → Step 6, 8 & 10 melibatkan pencucian pellet SILICA. Pellet SILICA bisa dipecahkan dengan pipet tip.

❖ **Residu GuSCN (Guanidium Thiocyanate) & EDTA**
 → Residu GuSCN dan EDTA akan menghalangi proses PCR.
 → pada step 9, pastikan lebih ethanol dibuang sepenuhnya dengan bantuan pipet.

Metode Ekstraksi Silica Bead (TACO mesin)

	1. Sample + Lysis buffer	2. Silica	3. Wash buffer	4. Elution buffer
Target	Nucleic acid		Proteins and Lipids	
Fungsi:	Pelepasan asam nukleat, Kestabilan	Penempelan asam nukleat	Purifikasi asam nukleat, pembuangan inhibitor	Recover asam nukleat
Reaksi Kimia:	High [GuSCN] neutral pH	High [GuSCN] neutral pH		Low [GuSCN] pH > 8.0

Proses:

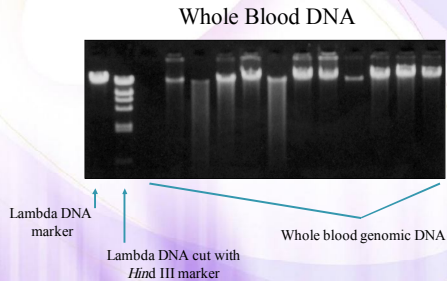
- Sample + Lysis buffer
- Silica
- Wash buffer
- Elution buffer

Output: Acid nukleat murni

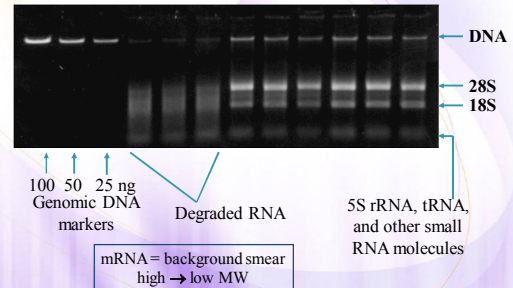
Analisa Asid Nukleat - Metode Konvensional

(Run crude extract DNA/RNA in agarose gel)

Kualitas DNA dalam 1% Agarose Gel



Kualitas RNA dalam 1% agarose gel



DNA/RNA kualitas profile - elektroforesis

Genomic DNA:

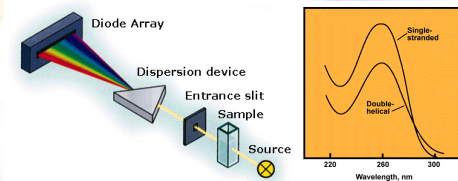
0.6% to 1% gel, running buffer electrophoresis at 70–80 volts, 45–90 minutes.

Total RNA:

1% to 2% gel, running buffer electrophoresis at 80–100 volts, 20–40 minutes.

Analisa Asam Nukleat - Spektrofotometri

Spektrofotometri



By measuring the amount of light absorbed by your sample at specific wavelengths, it is possible to estimate the concentration of DNA and RNA. Nucleic acids have an absorption peak at ~260nm.

Menentukan Konsentrasi

$$[\text{dsDNA}] \approx A_{260} \times (50 \mu\text{g/mL})$$

$$[\text{ssRNA}] \approx A_{260} \times (40 \mu\text{g/mL})$$

Menentukan Kemurnian

$$A_{260}/A_{280} \text{ ratio} = \sim 1.8 \text{ for dsDNA,} \\ \sim 2.0 \text{ for ssRNA.}$$

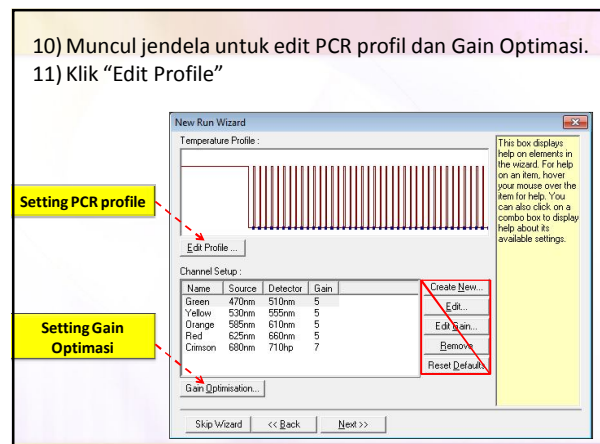
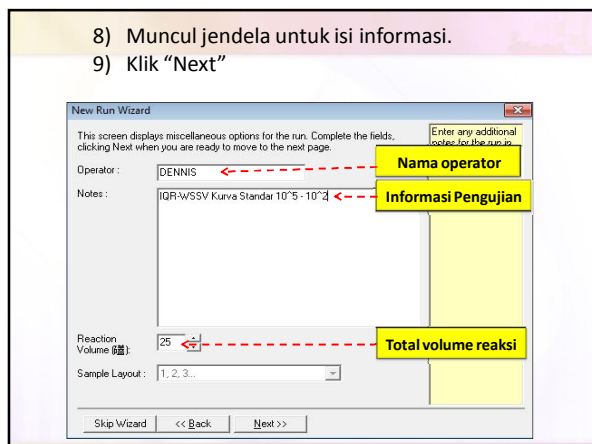
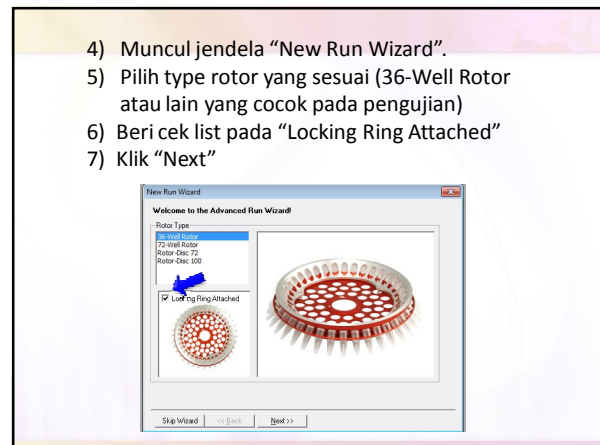
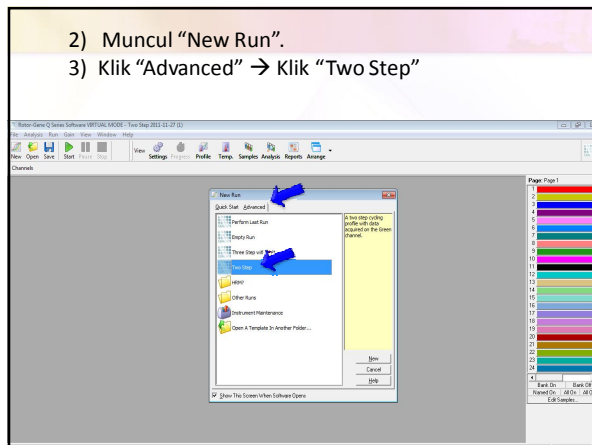
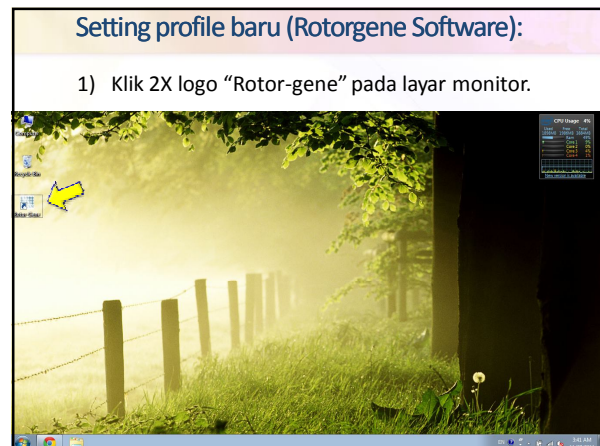
<1.7 = indicate significant protein contamination.

Kondisi Penyimpanan

- ❖ Simpan hasil ekstraksi DNA dalam TE buffer pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk jangka panjang.
- ❖ Simpan hasil ekstraksi RNA dalam RNase-free ultra pure water (example DEPC water) pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk jangka panjang.

❖ **DEPC (Diethylpyrocarbonate) ddH₂O**
→ DEPC berinteraksi dengan bagian aktif residu histidine pada RNase dan ireversibel menonaktifkan RNase.

Sekian Terima Kasih

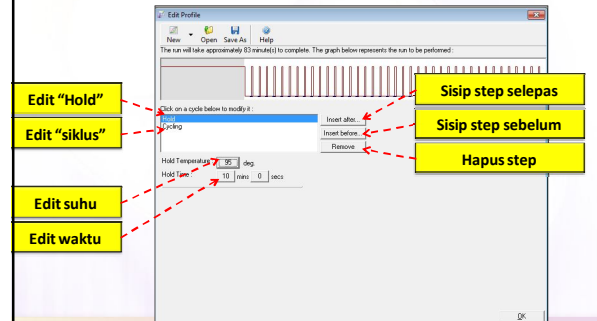


PCR profil setting (IQREAL test kit)

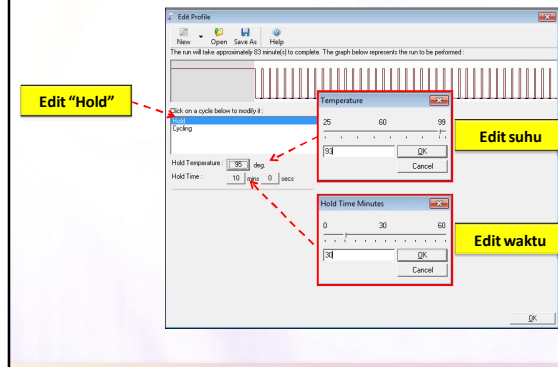
PROFIL DNA sahaja (WSSV, IHNV, KHV sahaja)	<ol style="list-style-type: none"> 93°C – 15 seconds 60°C – 60 seconds (ulangi 40 siklus)
PROFIL UNI-IQ RNA (DNA & RNA VIRUS test serentak) (WSSV, IHNV, TSV, IMNV, YHV, KHV, SVC)	<ol style="list-style-type: none"> 42°C – 30 minutes (Hold – 1 siklus) 93°C – 15 seconds 60°C – 60 seconds (ulangi 40 siklus)

12) Muncul jendela untuk edit profil siklus dan suhu.

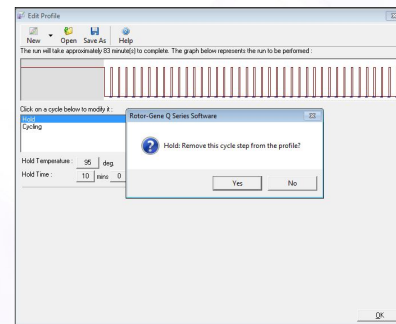
- ❖ Untuk RNA profile → klik “Hold” → klik edit suhu dan edit waktu.
- ❖ Untuk DNA profile → klik “Hold” → klik “Remove”



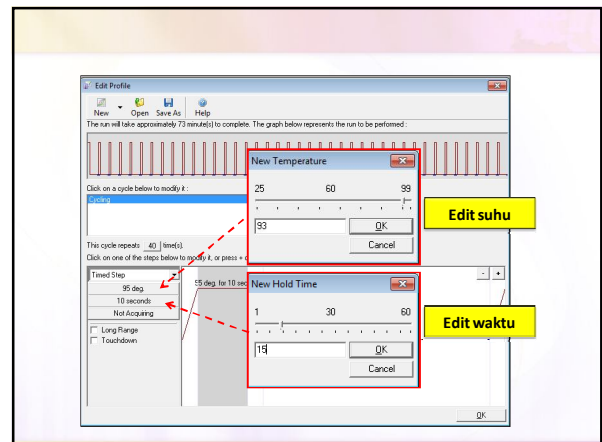
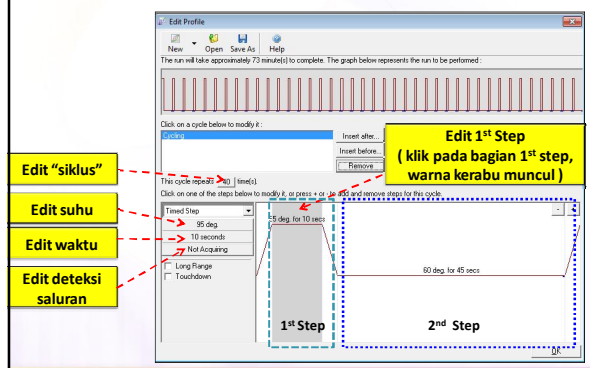
- ❖ Untuk RNA profile → klik “Hold” → klik edit suhu dan edit waktu.



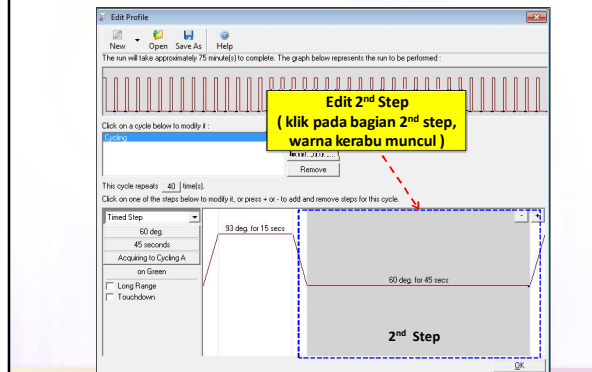
- ❖ Untuk DNA profile → klik “Hold” → klik “Remove” → klik “Yes”



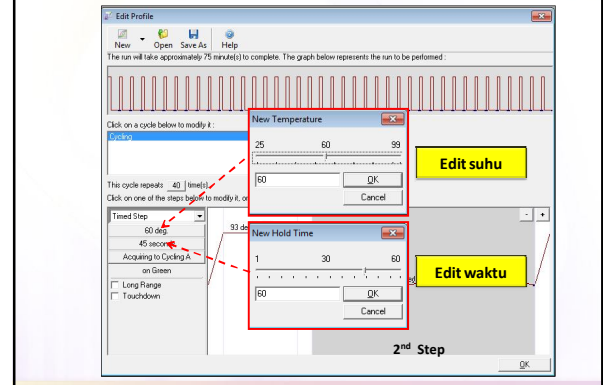
- 12) Muncul jendela untuk edit profil siklus, suhu, waktu, saluran.
- 13) Klik bagian 1st Step → klik edit suhu dan edit waktu.



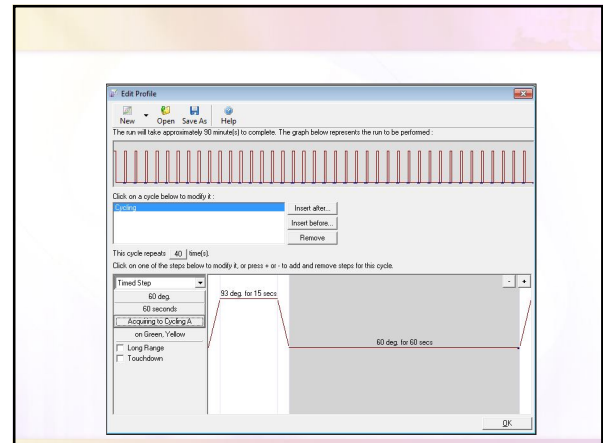
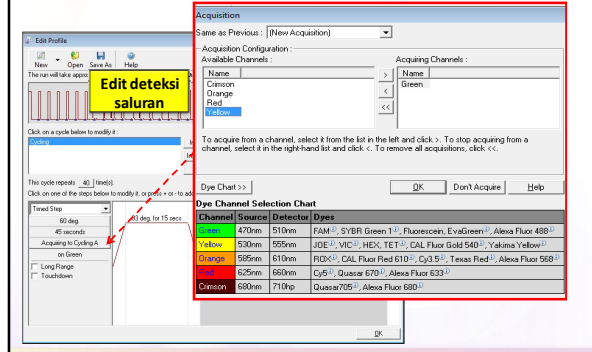
14) Klik bagian 2nd Step → klik edit suhu, edit waktu dan edit deteksi saluran.



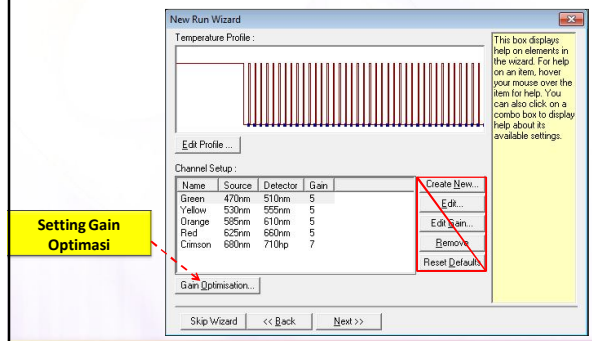
14) Klik bagian 2nd Step → klik edit suhu, edit waktu dan edit deteksi saluran.




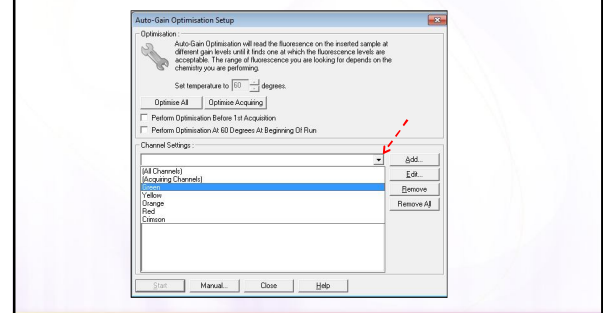
15) Muncul jendela edit deteksi saluran → klik “Yellow” → klik > → pastikan “Green” dan “Yellow” di dalam kotak “Acquiring Channels”



16) Klik “Gain Optimisation”

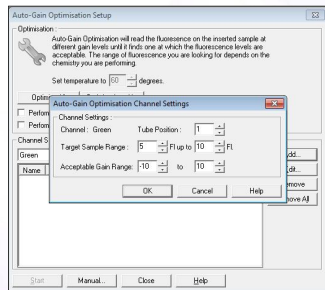


17) Klik tombol  pada “Channel Setting” → klik **Green** → klik “Add” (ulangi step sama untuk saluran **Yellow** selepas ini)



18) Klik “OK”.

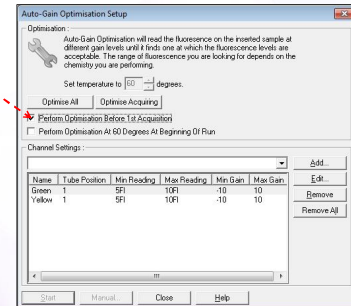
(ulangi step sama untuk saluran **Yellow** selepas ini)



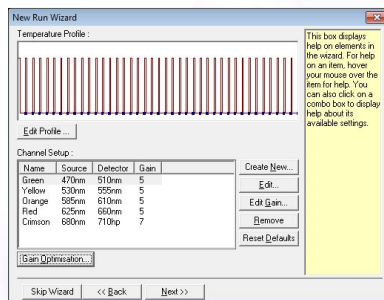
19) Beri cek list pada “Perform Optimisation Before 1st Acquisition”

20) Klik “Close”

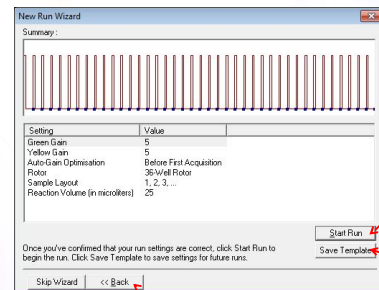
Beri cek list



21) Klik “Next” (setelah siap setting “Edit Profile” dan “Gain Optimisation”)



22) Klik “Save Template”

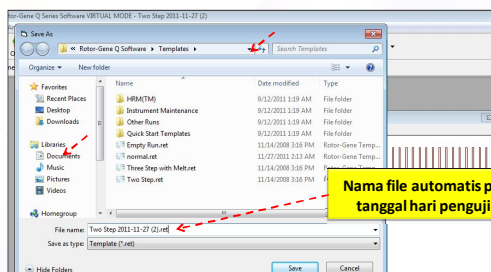


Mulai PCR test

PCR profile setting disimpan untuk pengujian selanjutnya

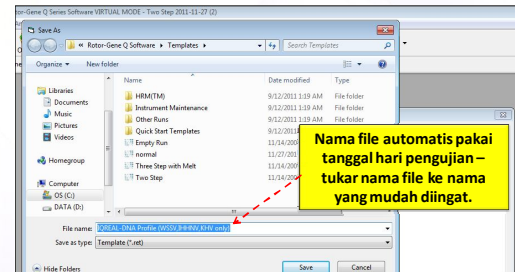
Mengubah setting awal

23) Muncul jendela “Save as” → cari/pilih lokasi folder untuk menyimpan setting PCR profile. (Nama PCR profile setting = *filename.ret*)



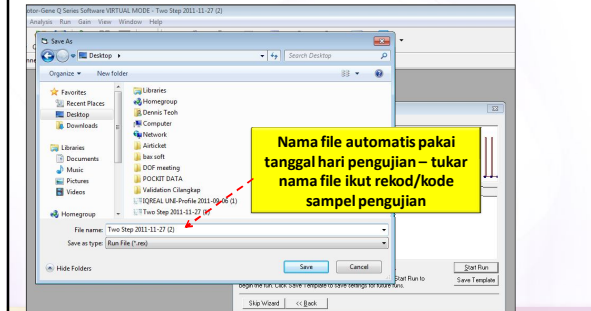
Nama file otomatis pakai tanggal hari pengujian

24) Tukar nama file yang diinginkan / mudah dikenali
25) Klik “Save”

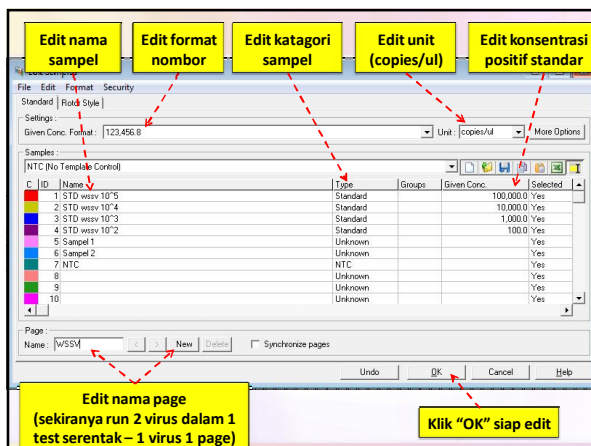
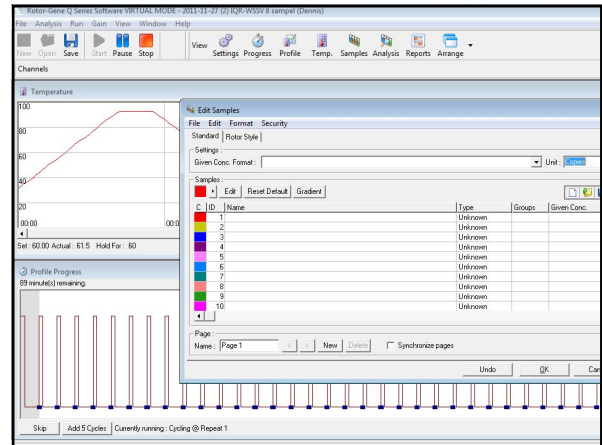
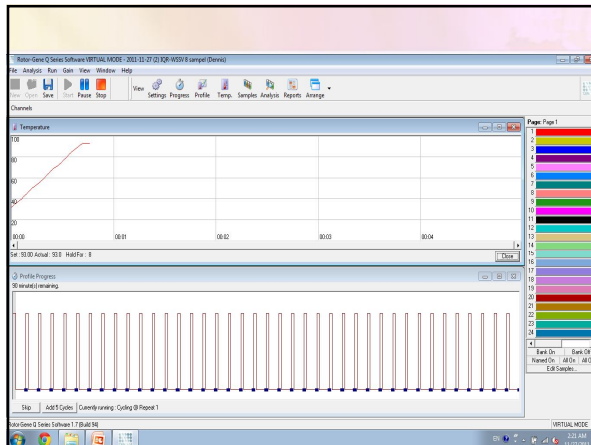
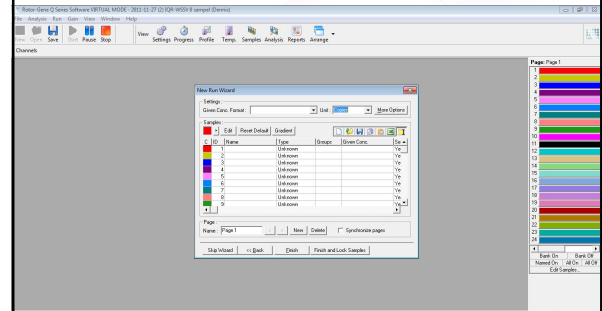


Nama file otomatis pakai tanggal hari pengujian – tukar nama file ke nama yang mudah diingat.

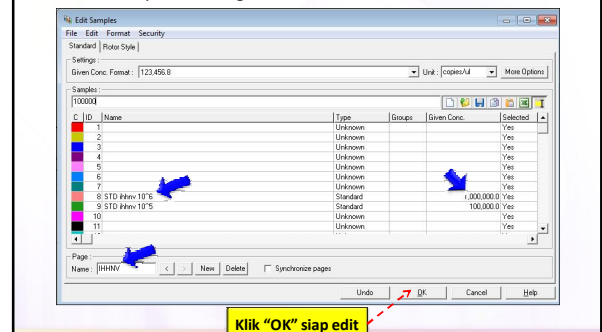
- 26) Klik "Start Run"
- 27) Muncul jendela "Save as" → cari/pilih lokasi folder untuk menyimpan data PCR file. (Nama data PCR = *filename.rex*)
- 28) Tukar nama file → klik "Save"

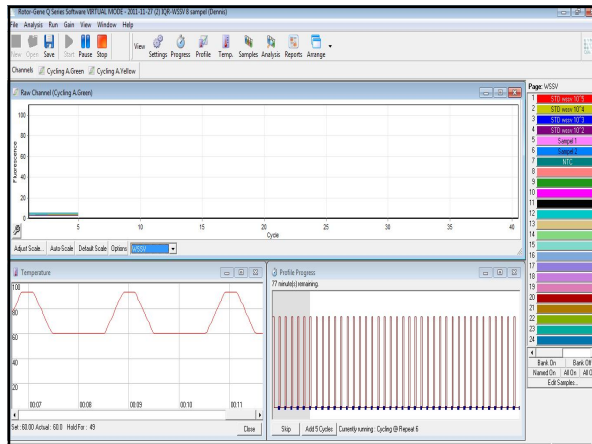


- 29) Muncul jendela label sampel pengujian.
 - Boleh edit sekarang ATAU
 - Klik "Finish" untuk edit kemudian (boleh edit semasa PCR test sedang dijalankan ATAU selepas siap PCR test).



- 30) Klik "New"
- 31) Muncul jendela "Edit Samples" baru
- 32) Start edit informasi (virus test ke-2) pada posisi yang cocok pada tabung dalam rotor tertentu.





Rotorgene Software

(PCR test tanpa tanpa re-setting PCR profile)

Pakai profile lama (Pra-setting IQREAL test):

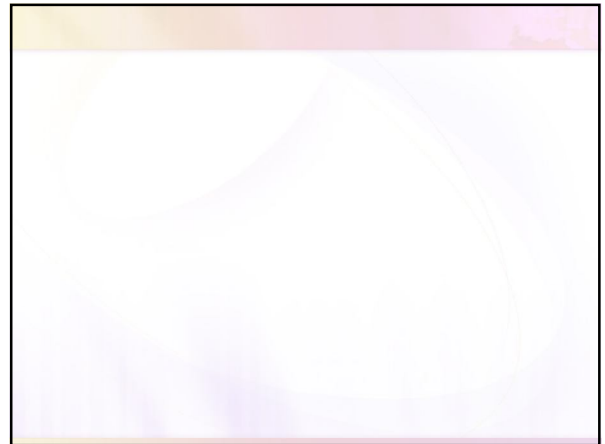
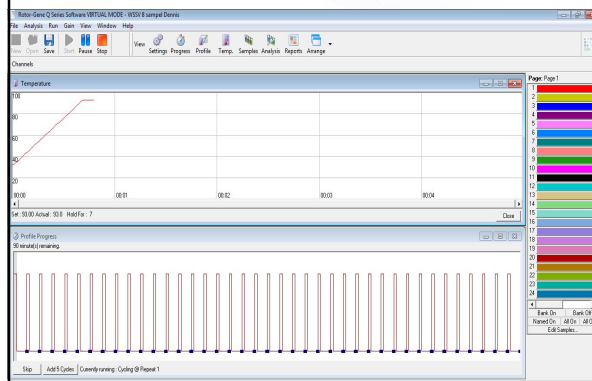
- 1) Klik 2X file yang berlabel **"IQREAL-DNA profile (wssv, ihhvv, khv only)"** (atau nama file lain) pada layar monitor.

- 2) Muncul layar utama software Rotorgene.
- 3) Klik tombol "START"

- 4) Muncul jendela "Profile Run Confirmation".
- 5) Klik "START"

- 6) Muncul jendela "Save as" → cari/pilih lokasi folder untuk menyimpan data PCR file. (Nama data PCR = *filename.rex*)
- 7) Tukar nama file → klik "Save"

- 8) IQREAL-PCR test mulai
- 9) Klik "Sample" untuk label/edit informasi sampel.



PIPETTING

PT Kinglab Indonesia

(5-9th December 2011)

Pengenalan :

- I. Kesalahan yang sering dilakukan
- II. SOP Penggunaan Mikropipet
- III. Maintenance Pipet

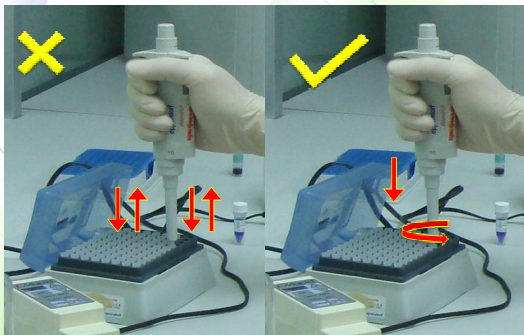
"Kesalahan" yang sering dilakukan oleh operator:

1. Pegang bagian ujung pipet semasa mengubah pipet volume.
2. Ketuk pipet dengan tip semasa ambil tip.
3. Letak pipet di atas bench semada tidak dipakai
4. Pipet tidak cocok dengan tips.
5. Pipet tidak lurus semasa ambil reagent.
6. Pipet masuk ke kedalaman yang salah.
7. Kotak tip tidak cocok dengan tip yang dipakai.
8. Pipet volume tidak set maximum semasa tidak dipakai
9. Ambil reagen dan bebas reagen dengan cepat
10. Pakai pipet volume besar ambil reagen volume kecil

1. Pegang bagian hujung pipet semasa mengubah pipet volume → Kontaminasi



2. "Ketuk" pipet dengan tip semasa ambil tip.



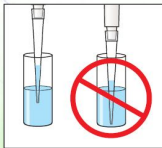
3. Letak pipet di atas bench semasa tidak dipakai → Kontaminasi



4. Pipet tidak cocok dengan tips
→ tekanan udara dalam tip tidak ketat,
reagen menitis keluar.



6. Pipet tip pada kedalaman yang salah.
→ terlalu dalam akan membentuk titisan pada dinding luar tip (pipetting lost – terutama Taq DNA Polymerase)
→ terlalu dangkal akan menyebabkan fluktuasi reagen (reagen tidak tepat)



Volume Pipet	Pencelupan optimum
0.1 - 10 µL	1-2 mm
10 - 200 µL	2-3 mm
200 - 2000 µL	3-6 mm
2000 µL and higher	6-10 mm

7. Kotak tip tidak cocok dengan tip yang dipakai.

TIPS – CAP ITIK PIPET – CAP AYAM KOTAK TIP – CAP SAPI



1. Pegang bagian hujung pipet semasa mengubah pipet volume.
2. Ketuk pipet dengan tip semasa ambil tip.
3. Letak pipet di atas bench semada tidak dipakai
4. Pipet tidak cocok dengan tips.
5. Pipet tidak lurus semasa ambil reagent.
6. Pipet masuk ke kedalaman yang salah.
7. Kotak tip tidak cocok dengan tip yang dipakai.
8. Pipet volume tidak set maximum semasa tidak dipakai
9. Ambil reagen dan bebas reagen dengan cepat
10. Pakai pipet volume besar ambil reagen volume kecil

SOP Penggunaan Mikropipet

SOP Penggunaan Mikropipet

- Pra-basahkan pipet tip
- Periksa tip sebelum dan selepas pipet
- Keluarkan pipet terus dan lurus dari bekas semasa ambil reagen.
- Pakai tip yang cocok pipet 100%
- Berhenti sebentar semasa aspirasi reagen
- Masuk tip pada kedalaman yang tepat
- Gunakan kuasa yang konsisten untuk aspirasi dan pelepasan reagen
- Volume pipet set ke maximum semasa tidak dipakai
- Operasi pada suhu yang sama (pipet dan reagen)
- Kurangkan sentuhan langsung dengan pipet dan bekas reagen

PERHATIAN – APLIKASI IQREAL KIT

PERHATIAN – APLIKASI IQREAL KIT



❖ Chloroform pelarut organik volatile yang cenderung meruap pada suhu ruang.

❖ Pemindahan chloroform dengan tip yang sama ke beberapa sampel tanpa pra-basah → volume reagen kurang pada sampel awal.

- ✓ Pra-basahkan pipet tip 3 kali dengan **Chloroform** → meningkatkan kelembapan ruangan udara tip, dengan demikian mengurangkan evaporasi reagen.

Recommendations for Pipetting different Solutions / Compounds

Solution / Compound	Examples	Pipette	Tip	Technique	Comments
Aqueous solution	Buffers, diluted salt solution	Air Displacement	Standard	Forward	
Viscous solution	Protein and nucleic solutions, glycerol, Tween 20/40/60/80	Air Displacement Pos. Displacement	Standard wide orifice Pos. Displacement	Reverse	Pipette slowly to avoid bubble formation.
Volatile compounds	Methanol, Hexane	Air Displacement Pos. Displacement	Filter Pos. Displacement	Forward	Pipette rapidly to avoid evaporation. Carbon filter tips prevent vapors from going into the Pipette.
Nucleotide solutions	Genomic DNA, PCR Products	Air Displacement Pos. Displacement	Filter or wide orifice Pos. Displacement	Forward	For genomic DNA wide orifice should be used to avoid mechanical shearing.
Radioactive compounds	³² P- Carboxylate, ³ H- thymidine	Air Displacement Pos. Displacement	Filter Pos. Displacement	Forward	
Acid / Alkalies	H ₂ SO ₄ , HCl, NaOH	Air Displacement Pos. Displacement	Filter Pos. Displacement	Forward	
Toxic samples					

Sterilisasi Pipet (De-kontaminasi – asid nukleat)

Metode-metode :

- Pembersihan Umum
- Autoclave (seluruh pipet)
- Glycine /HCl Solution (seluruh pipet)
- UV (permukaan)
- RNaseAWAY (permukaan)

Sterilisasi Pipet (Dekontaminasi – permukaan)

I. Pembersihan Umum

- Dismantle pipet
- Bersihkan piston dengan 70% etanol.
- Swap permukaan bagian atas, bawah dan ejektor sleeve dengan detergen, sabun atau Isopropanol.
- Cuci dengan ddH₂O, biar kering.



✓ Bleach / Chlorox (pemutih 5-10%)
→ Aplikasi pembersihan perlukan 0.05% - 0.5%. Pengenceran 10-100X pada pemutih.



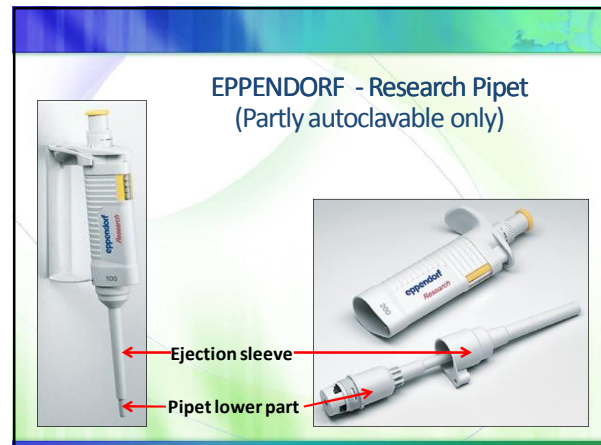
Sterilisasi Pipet (Dekontaminasi – asam nukleat)

II. Autoclaving

- Dismantle pipet
- Cuci kotoran pada permukaan pipet.
- Balut bagian pipet dengan autoclave bag, aluminum foil atau kertas.
- Suhu 121°C, pressure 1 bar, selama 20 menit.
- Biar dingin suhu ruang, kering.



1. Tidak boleh pakai detergen, sabun atau Sodium hypochlorite semasa autoclaving.
2. Suhu $\leq 121^{\circ}\text{C}$.



Sterilisasi Pipet (Dekontaminasi – asam nukleat)

III. Glycine/HCl (pH2)

Formula Pencuci: 10X stok solution

30.6 g	NaCl
39.2 g	Glycine
523 mL	ddH ₂ O
Tambah 1N HCl hingga 1000 mL	

Aplikasi :

- Mengencer 10X stok solution menjadi 1X buffer solution.
- Rendam bagian bawah pipet pada suhu 95°C selama 30 menit.
- Cuci bersih semua bagian dengan ddH₂O.
- Biar kering di bawah 60°C.
- Instal selepas capai suhu ruang.

Sterilisasi Pipet (Dekontaminasi – permukaan)

IV. UV

- a) Swap permukaan pipet dengan detergen, sabun atau Isopropanol.
- b) Cuci dengan ddH₂O, biar kering.
- c) Letak pipet di bench / laminarflow / PCR cabinet, on UV.



❖ **UV hanya sterilisasi permukaan pipet, bukan dalam pipet.**

1. 30-watt low-pressure mercury-vapor lamp.
2. Wavelength **254 nm**.
3. Jarak optimum lampu dan pipet ~ **60 cm**.

Sterilisasi Pipet (Dekontaminasi – permukaan)

IV. RNaseAWAY solution

- a) Semprot permukaan pipet dengan reagen RNaseAWAY.
- b) Swap dengan tisu bersih (lint free) .
- c) Cuci dengan ddH₂O, biar kering.



Key Faktor Sukses PCR



Cara Kerja Real-Time PCR

PT Kinglab Indonesia
(5-9th December 2011)

Ekstraksi

- Lysis buffer, Dtab-Ctab, RNA ekstraksi
- SILICA, TACO (automatis purifikasi mesin)

Real-Time PCR

- ON mesin, setup profil PCR
- AQ (4 standar positif + sampel + NTC)
- RQ (1 standar positif 10^4 + sampel + NTC)

Analisa hasil PCR

- Evaluasi data hasil PCR
- Report positif atau negatif

IQREAL – Preparasi PCR reagen - 1

• Silica Ekstraksi Kit (untuk 200 reaksi)

- a) Silica (8ml, 1g/ml)
- b) GT Buffer (280 ml)
- c) DEPC ddH₂O (200 ml)

• PCR komponen (untuk 200 reaksi)

- a) Real-Time PreMix (4 vials, 1100 ul/vial)
- b) Dual P(+) Standard (1 vial, 100 ul/vial, 10^6 copies/ul)
- c) Yeast tRNA (1 vial, 500 ul/vial, 40ng/ul)
- d) IQzyme DNA Polymerase (1 vial, 2U/ul, 400 ul/vial)
- e) RT enzyme (1 vial, 200ul/vial) – RNA virus sahaja

IQREAL PCR system – Preparasi standar kurva

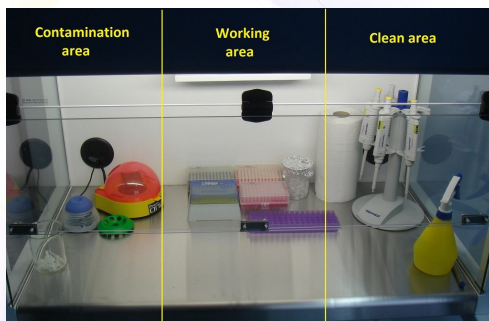
- Stok dual-standar positif 10^6 DNA WSSV + 10^6 DNA Udang.
- Seri pengenceran standar positif simpan selama 2-4 minggu.
- Sediakan kurva standar positif –
 - ❖ Setiap kali buka kit PCR baru
 - ❖ Setiap 50 test

2 ul Standar Positif + 18 ul yeast tRNA



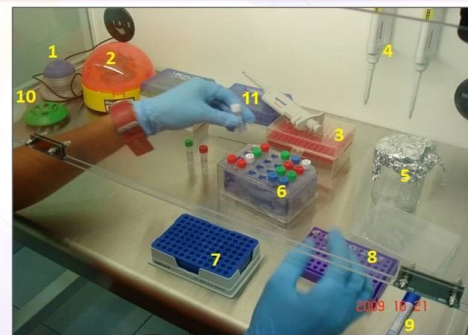
“sekurang-kurang 4 standar positif per test”

IQREAL – Preparasi PCR reagen - 2



Kawasan preparasi PCR reagen dibahagi ke 3 bagian

IQREAL – Preparasi PCR reagen - 3



Peralatan yang dibutuhi semasa preparasi PCR reagen

- 1) **Vortex mixer** – vortex (mixing) reagen atau DNA sampel sepenuhnya sebelum dipakai.
- 2) **Mini-spin** – untuk turunkan reagen yang berada di bagian penutup tabung 1.5ml and tabung PCR 0.2ml sebelum dibuka dan dipakai.
- 3) **Filtertips** – filtertips boleh mengurangi kontaminasi berlaku. Pengajian menunjukkan pakai filtertips boleh mengurangi 80% kontaminasi berlaku.
- 4) **Kualitas pipet bagus dengan pipet holder** – pipet kualitas bagus untuk memastikan pemindahan PCR reagen yang akurasi. Pastikan pipet diletak pada pipet holder semasa tidak dipakai, untuk mengelakkan kontaminasi pada pipet.
- 5) **Konsumabel disimpan dalam bekas bersih yang ditutup** –
- 6) **1.5ml cooler** – semasa preparasi PCR reagen, pastikan PCR reagen yang sensitif suhu sentiasa dalam kondisi dingin.
- 7) **0.2ml PCR cooler** – PCR mastermix disediakan dalam kondisi dingin.
- 8) **0.2ml PCR rack** – untuk label tabung PCR 0.2ml.
- 9) **Spedortersendiri** – spedor jangan diambil masuk atau keluar dari PCR kabinet.
- 10) **Bekas untuk buang tips** – bekas jangan diambil masuk atau keluar dari PCR kabinet.
- 11) **Ukuran tips yang panjang** – filtertips 10ul harus butuhi ukuran 4cm ke atas, untuk mengelakkan sentuhan pipet dengan reagen.

Cara Kerja Preparasi PCR mastermix

PCR Reagen Preparasi (IQREAL vs IQ2000):

IQ2000-WSSV	1ST PCR	
	First PCR Premix	→ 7.5 ul
	IQzyme DNA Polymerase	→ 0.5 ul
	Sample DNA / P(+) Std	→ 2.0 ul
	Nested PCR	
	Nested PCR Premix	→ 14 ul
	IQzyme DNA Polymerase	→ 1.0 ul
IQREAL-WSSV	Real-Time Premix	→ 21 ul
	IQzyme DNA Polymerase	→ 2.0 ul
	Sample DNA / P(+) Std	→ 2.0 ul

IQREAL PCR System

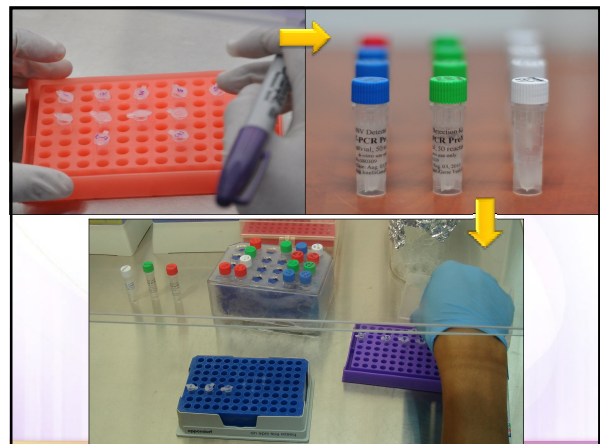
Preparasi reagen butuh untuk satu 0.2ml tabung PCR

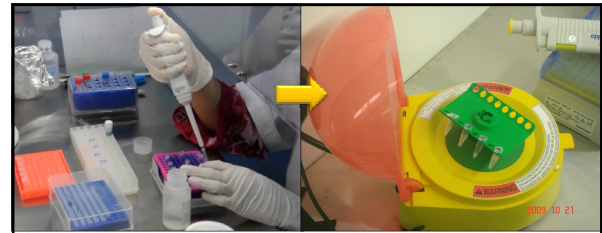
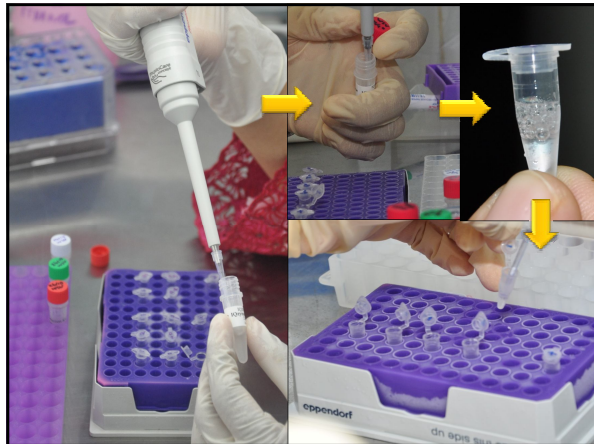
IQREAL-DNA VIRUS (WSSV, IMNV, KHV)	Real-Time Premix	→ 21.0 ul
	IQzyme DNA Polymerase	→ 2.0 ul
	Sample DNA / P(+) Std	→ 2.0 ul
IQREAL-RNA VIRUS (TSV, IMNV, YHV, SVC)	Real-Time Premix	→ 20.0 ul
	IQzyme DNA Polymerase	→ 2.0 ul
	RT-enzyme	→ 1.0 ul
	Sample RNA / P(+) Std	→ 2.0 ul

Langkah Kerja:

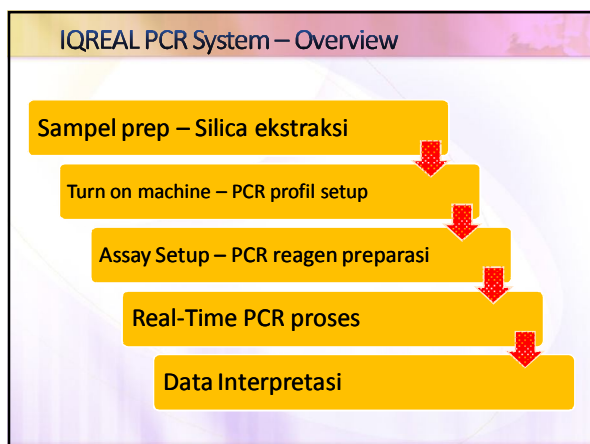
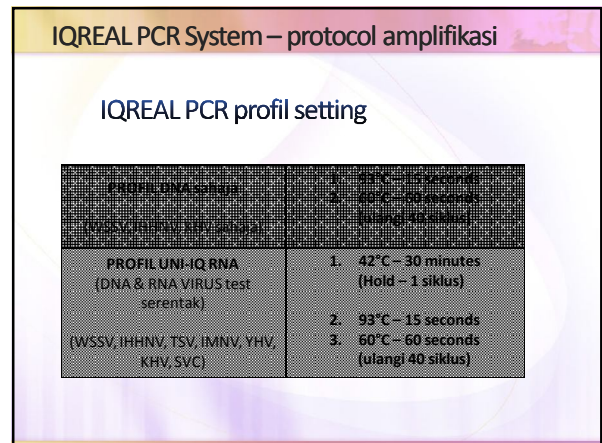
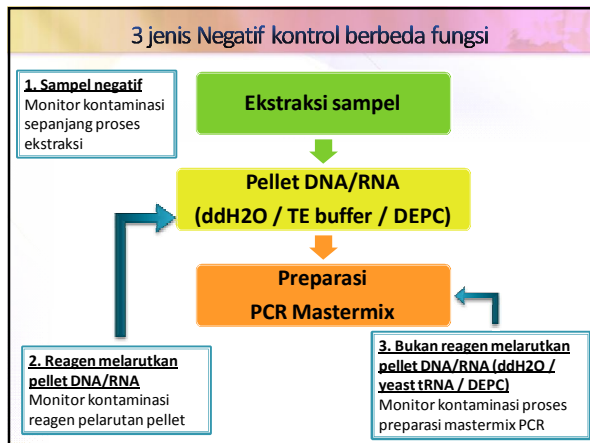
- a. Sediakan kuantitas tabung 0.2ml yang butuh untuk semua PCR reaksi – sampel, positif standar, NTC (negatif kontrol)
- b. Sediakan Tabung 1.5ml sekiranya volume PCR mastermix melebihi 200ul.
- c. Label semua tabung PCR 0.2ml di rak PCR (jangan label tabung pada PCR cooler 0.2ml – kurangkan sentuhan pada PCR cooler, cooler boleh kekal dingin lebih lama)
- a. Keluarkan reagen Real-Time Premix, Positif kontrol dan yeast tRNA buffer, biar cair.
- b. Keluarkan cooler 1.5ml dan cooler 0.2ml dari freezer. Pindahkan semua tabung kosong 0.2ml ke cooler.
- c. Real-Time Premix di mixing dengan up side down (elakkan vortex kuat). Ulangi mixing dengan pipet reagen ulang beberapa kali dengan filtertips kemudian.
- d. spin 1 detik semua tabung reagen sebelum dibuka penutupnya. (supaya tiada reagen pada penutup semasa kita buka – kontaminasi)
- e. Keluarkan IQzyme dari freezer, letak dalam cooler 1.5ml.
- f. Pindahkan IQzyme yang dibutuh ke tabung mastermix.
- g. Pindahkan Real-Time Premix yang dibutuh ke dalam tabung mastermix. Mixing mastermix reagen dengan filtertips yang sama, elakkan pembentukan buih (bubble)
- h. Tips – jangan tekan semua atau lepas semua tombol pipet semasa mixing.
- i. Pindahkan 23ul reagen mastermix ke semua tabung baru 0.2ml.
- j. Pindahkan 2ul NTC ke dalam tabung PCR yang punya 23ul reagen mastermix.
- k. Pindahkan 2ul sampel DNA ke dalam tabung PCR yang punya 21ul reagen mastermix.
- l. Pindahkan 2ul positif kontrol ke dalam tabung PCR yang punya 21ul reagen mastermix.
- m. Spin 1 detik semua tabung PCR 0.2ml, masukkan tabung ke PCR mesin.

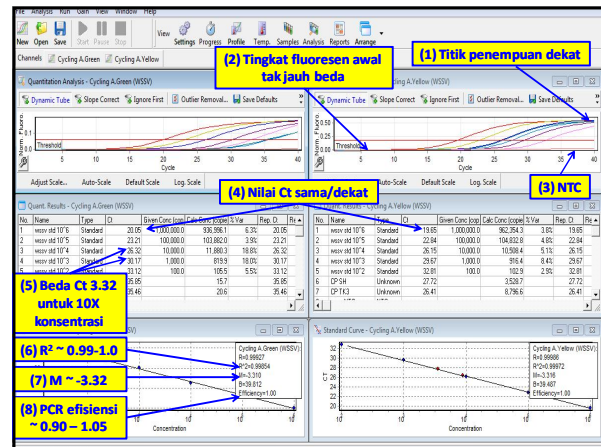
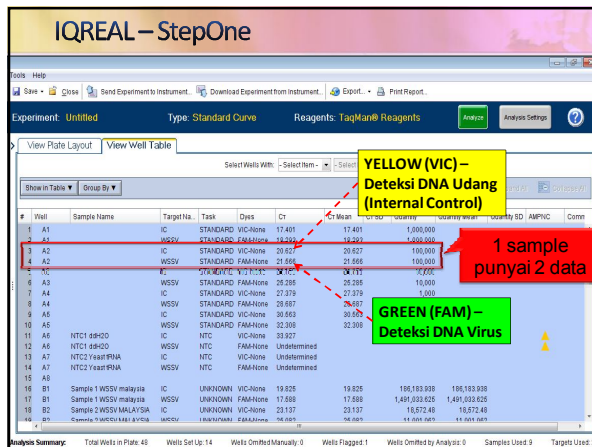
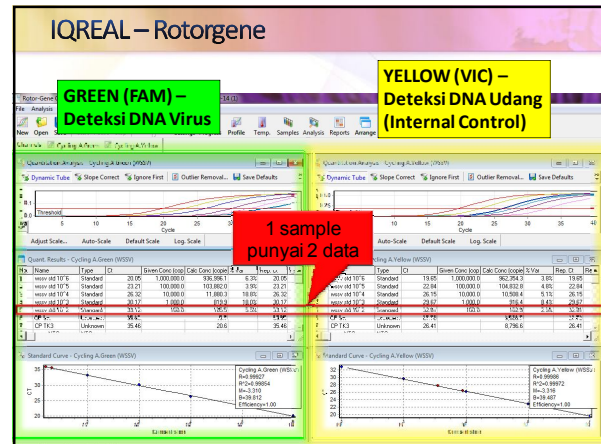
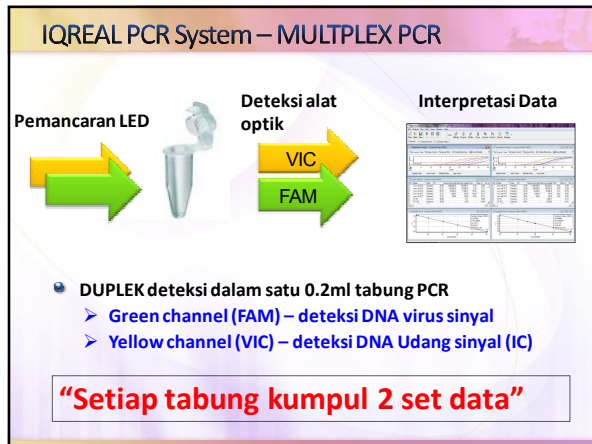
Jangan keluarkan IQzyme (Taq DNA Polymerase) sampai ia butuh dipakai.





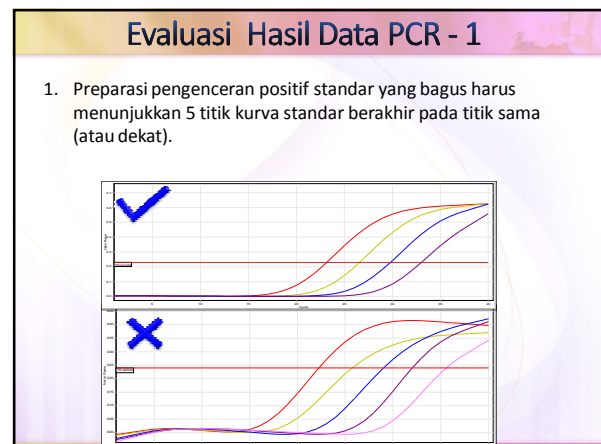
Masukkan 2ul template DNA ke dalam tabung PCR
→ NTC → DNA sampel → Positif kontrol





Evaluasi Hasil Data PCR

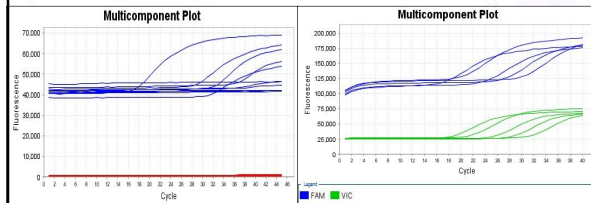
1. Preparasi pengenceran positif standar yang bagus harus menunjukkan 5 titik kurva standar berakhir pada titik sama (atau dekat).
2. Preparasi reagen yang bagus akan menghasilkan baseline yang bagus, sinyal fluoresen mula dari titik sama/dekat.
3. NTC tidak potong baris threshold
4. Perbedaan nilai Ct target DNA virus dan target DNA udang harus sama/dekat.
5. Perbedaan nilai Ct antara pengenceran 10X ialah 3.32 (konsisten 3.0-3.5)
6. R^2 harus di lingkungan 0.99-1.00
7. Kelerengan (M) kurang lebih -3.32
8. PCR efficiency kurang lebih 0.90-1.05



Evaluasi Hasil Data PCR - 2

2. Preparasi reagen yang bagus akan menghasilkan baseline yang bagus, sinyal fluoresen mula dari titik sama/dekat.

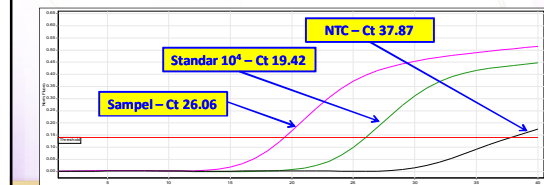
- Mixing reagen tidak sempurna → konsentrasi berlainan.
- Volume reagen dalam tabung PCR 0.2ml tidak sama.



Evaluasi Hasil Data PCR - 3

3. Ada nilai Ct pada NTC, sinyal yang terkumpul memotong garis threshold.

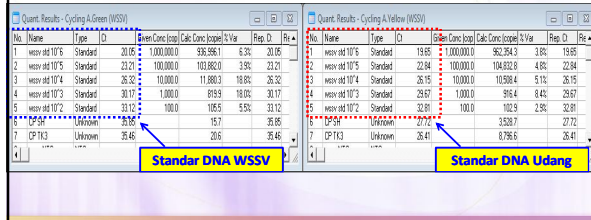
- Kontaminasi template selama PCR reagen preparasi.
- Optimasi desain PCR reagen tidak bagus – wujudnya primer-dimer atau hair-loop.
- Konsentrasi primer tidak optimasi.
- Konsentrasi ion bebas tidak tepat
- Reagen premix tidak sesuai, coba dengan reagen premix brand lain.



Evaluasi Hasil Data PCR - 4

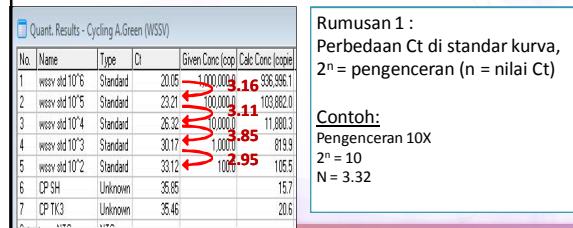
4. Standar punyai konsentrasi sama harus punyai nilai Ct sama.

- Origin stok dual-standar positif 10⁶ DNA WSSV + 10⁶ DNA Udang.
- Mixing reagen tidak sempurna → konsentrasi berlainan.
- Volume reagen dalam tabung PCR 0.2ml tidak sama.



Evaluasi Hasil Data PCR - 5

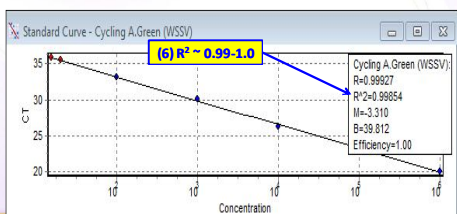
5. Perbedaan nilai Ct antara pengenceran 10X harus 3.32 (konsisten 3.1 – 3.5)
- Origin stok dual-standar positif 10⁶ DNA WSSV + 10⁶ DNA Udang.
 - Mixing reagen tidak sempurna → konsentrasi berlainan.
 - Volume reagen dalam tabung PCR 0.2ml tidak sama.



Evaluasi Hasil Data PCR - 6

6. R² harus di lingkungan 0.99 – 1.00.

- Semua 5 titik standar positif membentuk garis LURUS = 1.00.
- Mixing reagen tidak sempurna → konsentrasi berlainan.
- Volume reagen dalam tabung PCR 0.2ml tidak sama.
- Seri pengenceran standar sudah degradasi – selepas banyak kali frozen-cair (sediakan pengenceran standar baru)



Evaluasi Hasil Data PCR - 7

7. Kelerengan/kecurunan (M) harus kurang lebih -3.3219.

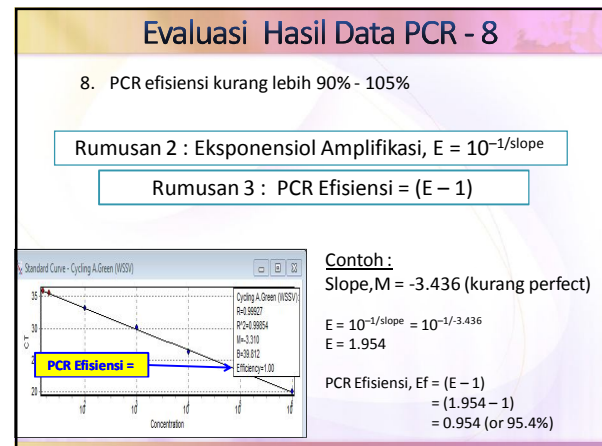
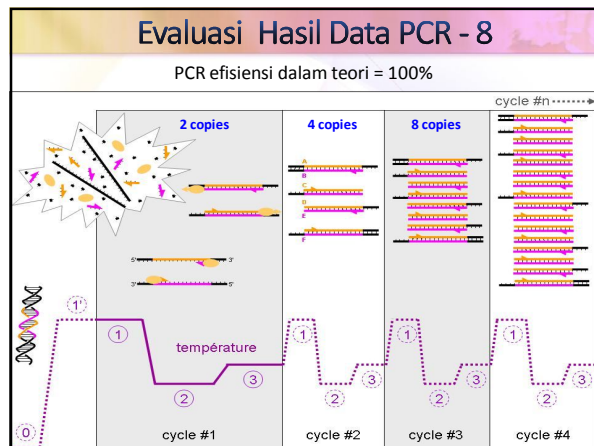
- Semua 5 titik standar positif membentuk garis LURUS
- Mixing reagen tidak sempurna → konsentrasi berlainan.
- Volume reagen dalam tabung PCR 0.2ml tidak sama.

Rumusan 2 : Eksponensial Amplifikasi, $E = 10^{-1/\text{slope}}$

- ❖ Seandainya setiap siklus PCR, proses PCR akan menghasilkan 2 kali ganda produk PCR (maka E = 2).



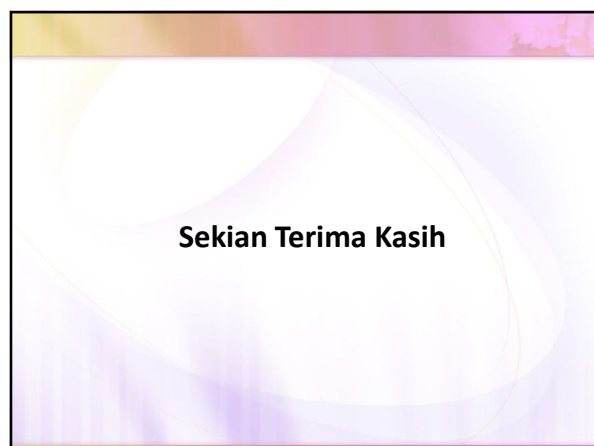
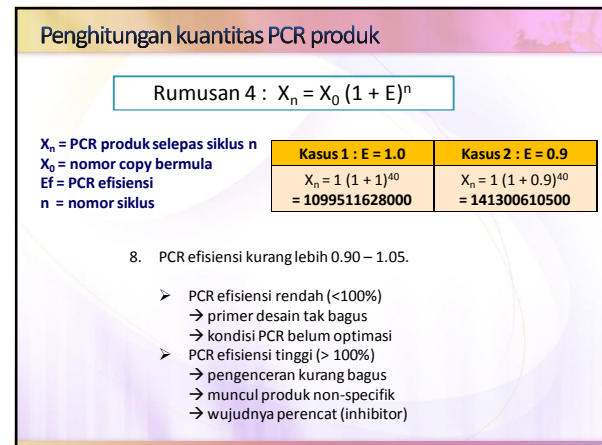
Contoh:
 $E = 10^{-1/\text{slope}}$
 $2 = 10^{-1/\text{slope}}$
Slope (M) = -3.3219

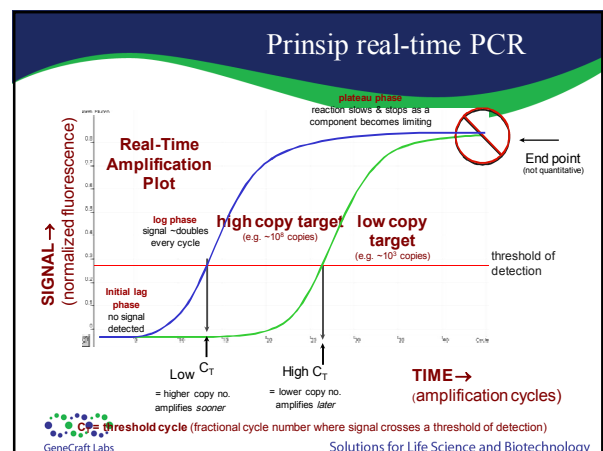
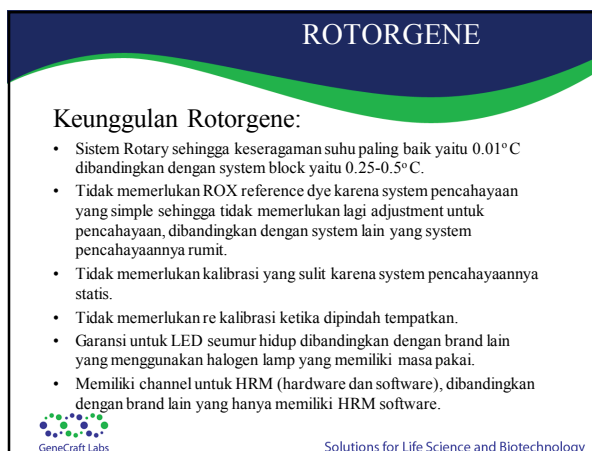
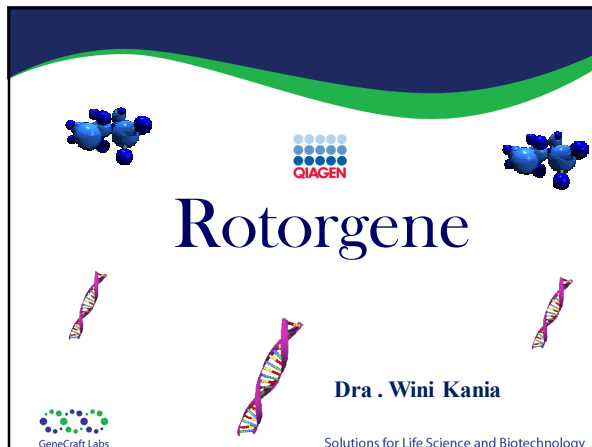


Pentingkah PCR efisiensi?

Cycles	A	B	C	D	E
1	0	0	0	0	0
2	1	2	2	2	2
3	4	8	8	8	8
4	16	32	32	32	32
5	64	128	128	128	128
6	256	512	512	512	512
7	1024	2048	2048	2048	2048
8	4096	8192	8192	8192	8192
9	16384	32768	32768	32768	32768
10	65536	131072	131072	131072	131072
11	262144	524288	524288	524288	524288
12	1048576	4194304	4194304	4194304	4194304
13	4194304	16777216	16777216	16777216	16777216
14	16777216	67108864	67108864	67108864	67108864
15	67108864	268433456	268433456	268433456	268433456
16	268433456	1073741824	1073741824	1073741824	1073741824
17	1073741824	4294967296	4294967296	4294967296	4294967296
18	4294967296	17189868416	17189868416	17189868416	17189868416
19	17189868416	68759473664	68759473664	68759473664	68759473664
20	68759473664	275037894656	275037894656	275037894656	275037894656
21	275037894656	1100151578624	1100151578624	1100151578624	1100151578624
22	1100151578624	4400606314496	4400606314496	4400606314496	4400606314496
23	4400606314496	17602425257984	17602425257984	17602425257984	17602425257984
24	17602425257984	70409701031936	70409701031936	70409701031936	70409701031936
25	70409701031936	281638804127744	281638804127744	281638804127744	281638804127744
26	281638804127744	1126555216510976	1126555216510976	1126555216510976	1126555216510976
27	1126555216510976	4506220866043904	4506220866043904	4506220866043904	4506220866043904
28	4506220866043904	18024883464175616	18024883464175616	18024883464175616	18024883464175616
29	18024883464175616	72099533856702464	72099533856702464	72099533856702464	72099533856702464
30	72099533856702464	288398135426809856	288398135426809856	288398135426809856	288398135426809856
31	288398135426809856	1153592541707239424	1153592541707239424	1153592541707239424	1153592541707239424
32	1153592541707239424	4614370166828957696	4614370166828957696	4614370166828957696	4614370166828957696
33	4614370166828957696	18457480667315830784	18457480667315830784	18457480667315830784	18457480667315830784
34	18457480667315830784	73829922669267323136	73829922669267323136	73829922669267323136	73829922669267323136
35	73829922669267323136	295319690689069292544	295319690689069292544	295319690689069292544	295319690689069292544
36	295319690689069292544	1181278762756277169024	1181278762756277169024	1181278762756277169024	1181278762756277169024
37	1181278762756277169024	4725115051025108676096	4725115051025108676096	4725115051025108676096	4725115051025108676096
38	4725115051025108676096	189004602050003547072	189004602050003547072	189004602050003547072	189004602050003547072
39	189004602050003547072	756018408200014188288	756018408200014188288	756018408200014188288	756018408200014188288
40	756018408200014188288	3024073632800056737152	3024073632800056737152	3024073632800056737152	3024073632800056737152
41	3024073632800056737152	12096294531200026948608	12096294531200026948608	12096294531200026948608	12096294531200026948608
42	12096294531200026948608	48385178124800107794432	48385178124800107794432	48385178124800107794432	48385178124800107794432
43	48385178124800107794432	193540712509120431177728	193540712509120431177728	193540712509120431177728	193540712509120431177728
44	193540712509120431177728	774162850036481724710016	774162850036481724710016	774162850036481724710016	774162850036481724710016

Siklus 35 Siklus 40





Cara Kerja Rotorgene

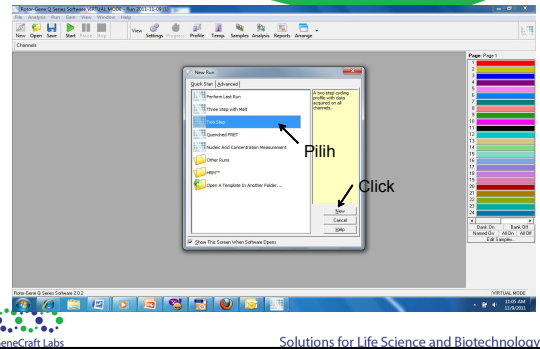
- Nyalakan Laptop
- Nyalakan Rotor Gene
- Persiapkan reaksi Real Time PCR sesuai dengan petunjuk kit.
- Double Click icon

Rotor-Gene Q Series Software 1.7.Ink



Solutions for Life Science and Biotechnology

Window Awal

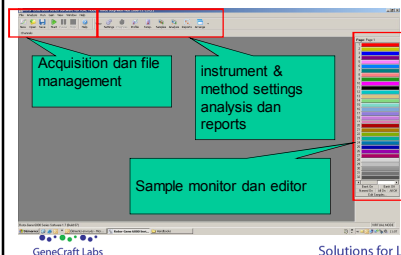


Solutions for Life Science and Biotechnology

Rotorgene Q Software

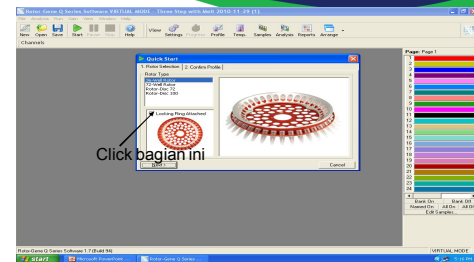
Rotor-Gene Q Series Software 1.7.Ink

Double klik pada RGQ Q series software version 1.7 desktop icon to initiate the software. Screen pembuka akan muncul pertama kali software dibuka



Solutions for Life Science and Biotechnology

Check Rotor



Untuk 0.2 ml PCR tube pakai rotor merah. Terlebih dahulu buka locking ring (warna silver) kemudian masukan PCR tube kedalam lubang antara 1-36. Jangan lupa tempelkan locking ring kembali seperti diatas.



Solutions for Life Science and Biotechnology

Contoh Program Real time PCR



Real-time cyler conditions

Step	Time	Temperature
PCR initial activation	5_min	95°C
2-step cycling:		
Denaturation	5_s	95°C
Annealing	10_s	60°C

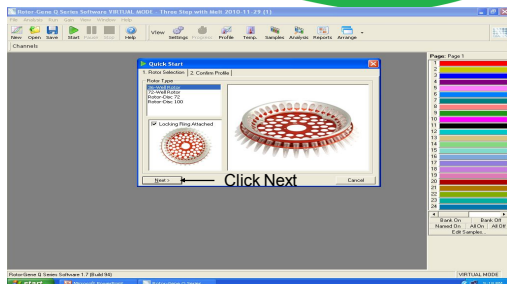
Jumlah cycle 35

Pewarna: FAM—channel: green



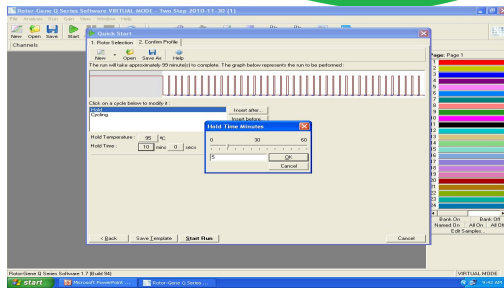
Solutions for Life Science and Biotechnology

Check Rotor



Solutions for Life Science and Biotechnology

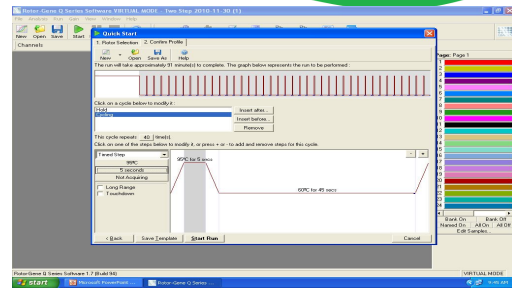
Program PCR untuk initial denaturation



Ubah waktu jadi 5 menit

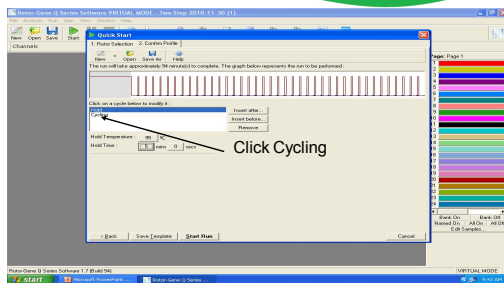
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur waktu pada step cycling



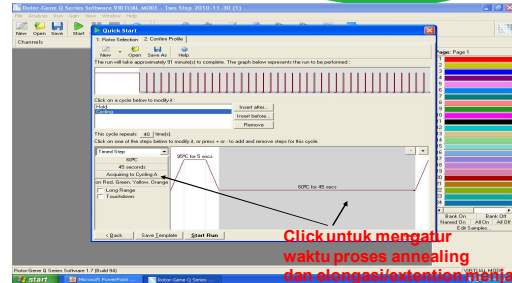
Solutions for Life Science and Biotechnology

Program PCR untuk step cycling



Solutions for Life Science and Biotechnology

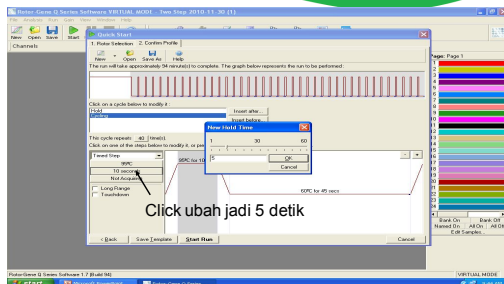
Atur waktu pada step cycling



Solutions for Life Science and Biotechnology

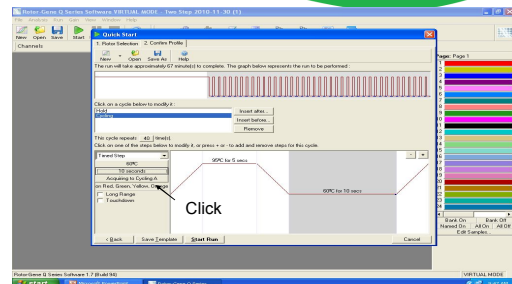
Click untuk mengatur waktu proses annealing dan elongasi/extension menjadi 10 detik

Atur waktu pada step cycling



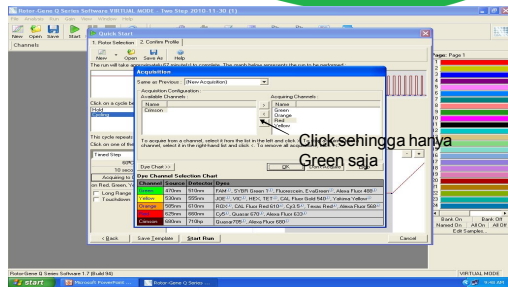
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur Channel



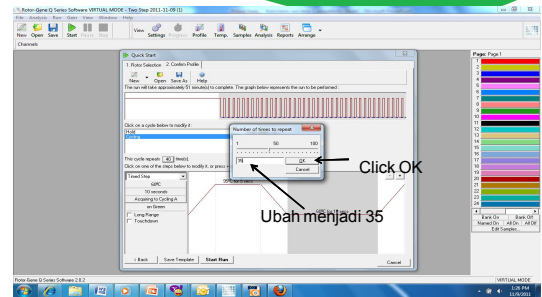
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur Channel



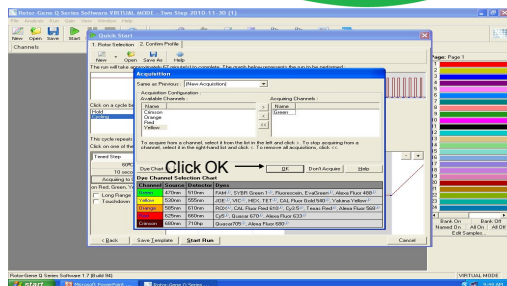
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur cycle



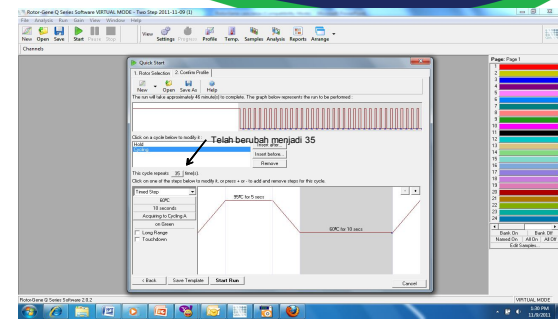
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur Channel



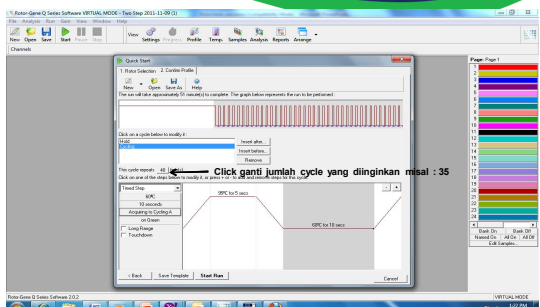
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur cycle



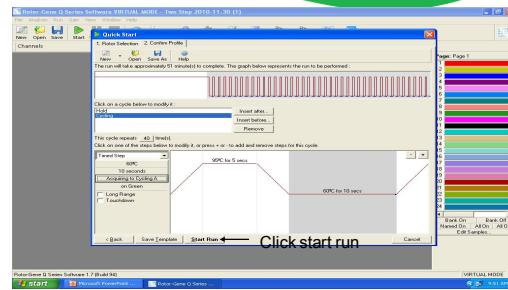
Solutions for Life Science and Biotechnology

Atur cycle



Solutions for Life Science and Biotechnology

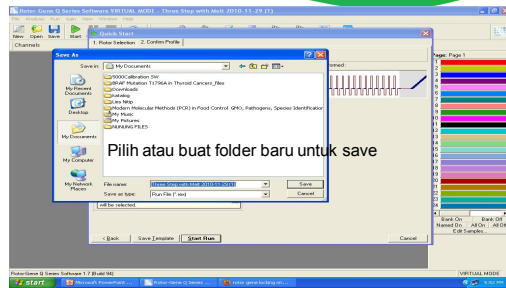
Start Run



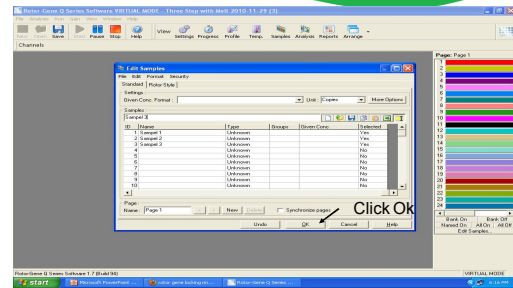
Mesin akan mulai bunyi dan running setelah di click

Solutions for Life Science and Biotechnology

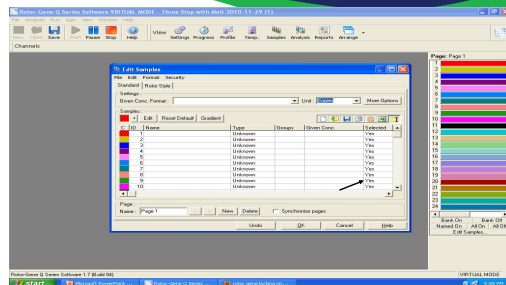
Save Run File



Pengisian nama sample

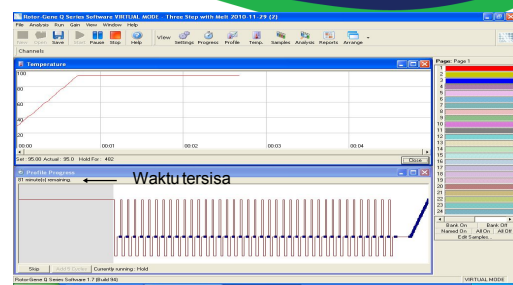


Pengisian nama sample



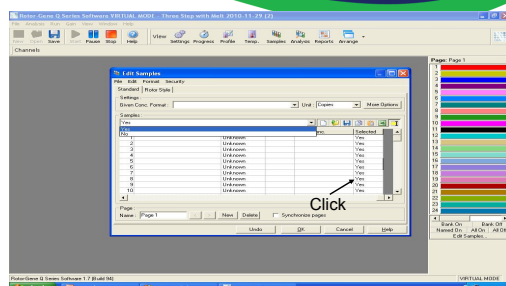
Masukkan detail sampel dan pilih **No** untuk sampel yang tidak dilakukan

Run



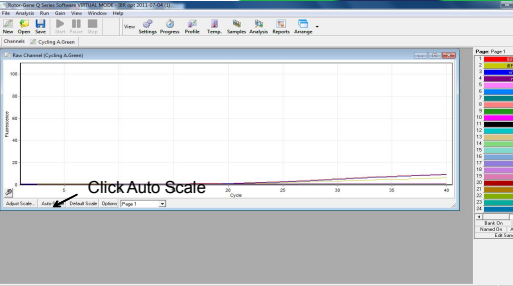
Tunggu sampai selesai sampai terlihat tulisan **run completed**

Pengisian nama sample

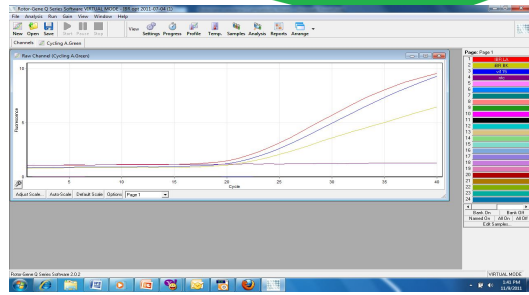


Pilih **No** untuk sampel yang tidak digunakan

Hasil

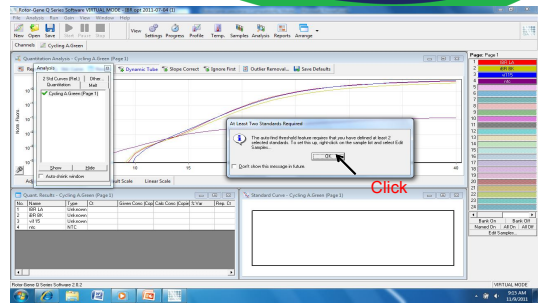


Hasil



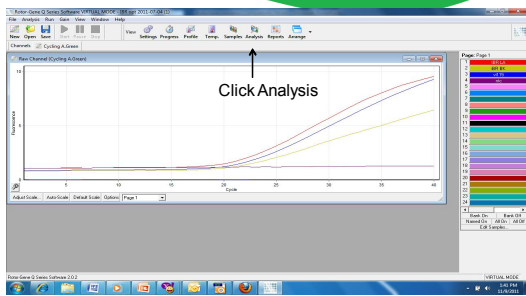
Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis



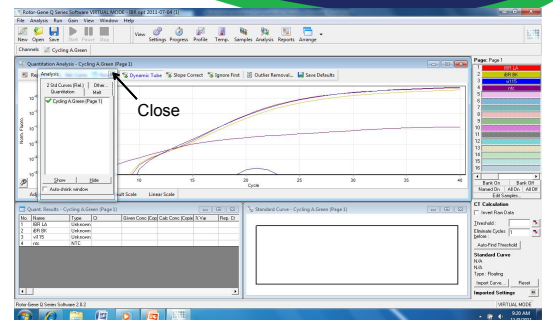
Solutions for Life Science and Biotechnology

Hasil



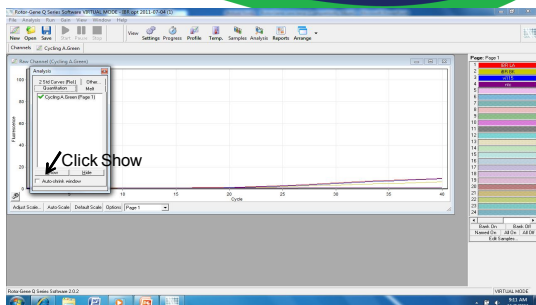
Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis



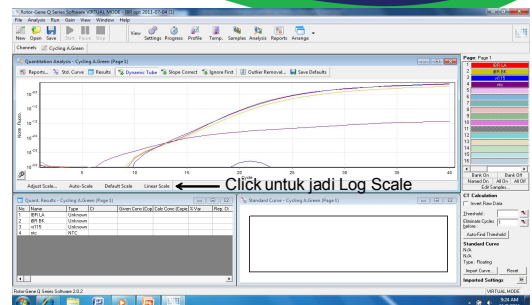
Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis



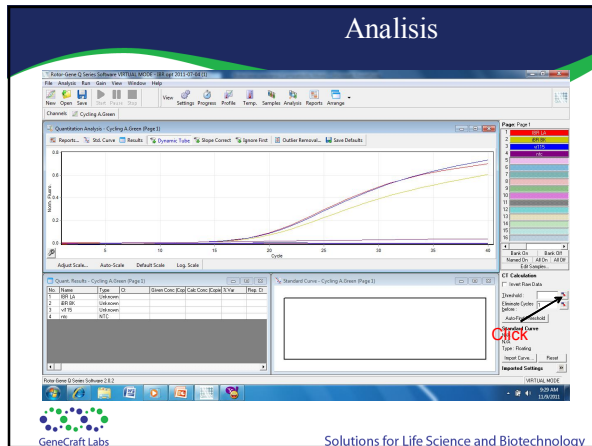
Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis



Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis

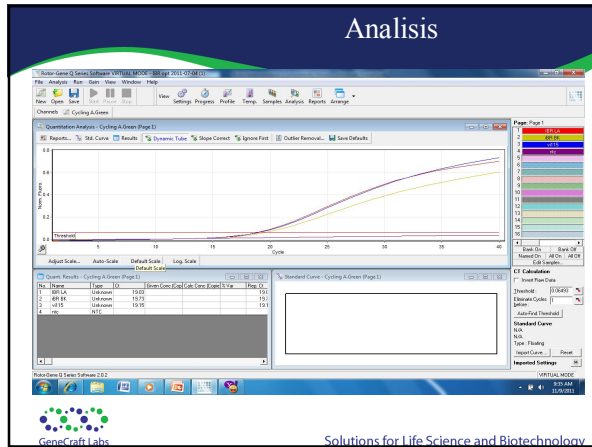


ANALISIS MELT CURVE



Solutions for Life Science and Biotechnology

Analisis



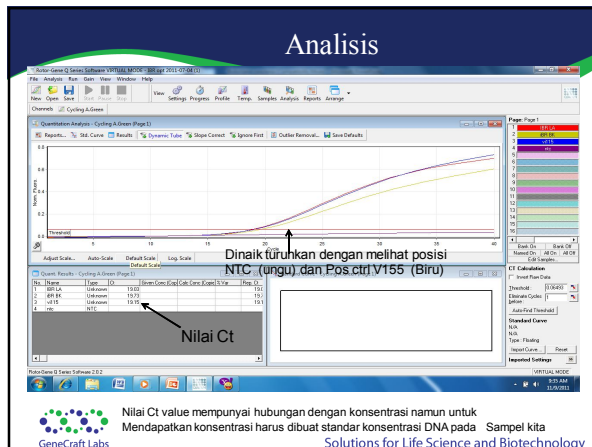
Contoh Program

PCR initial activation	10 min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	10 s	94°C
Annealing	5 s	51°C
Extension	20 s	72°C
Jumlah cycle 40		
Melt	30s	55°C-95°C

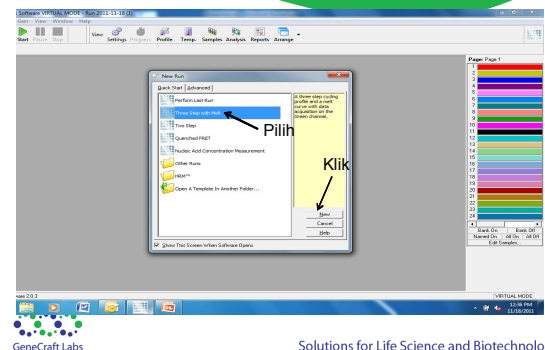


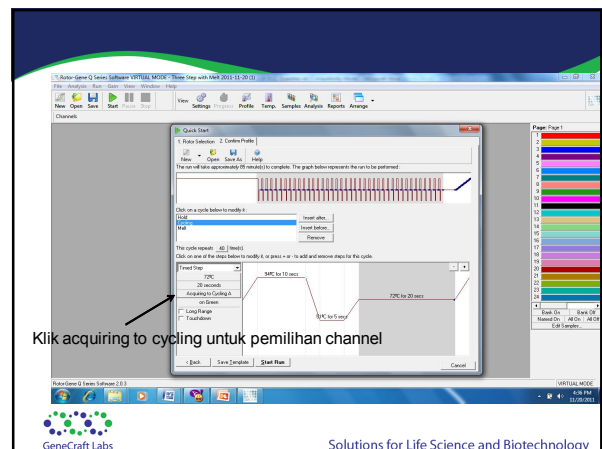
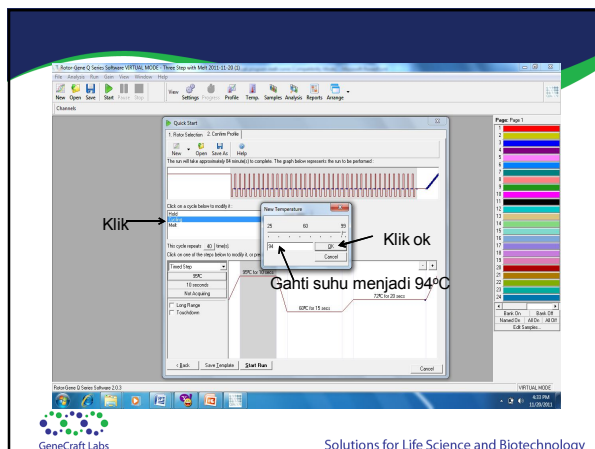
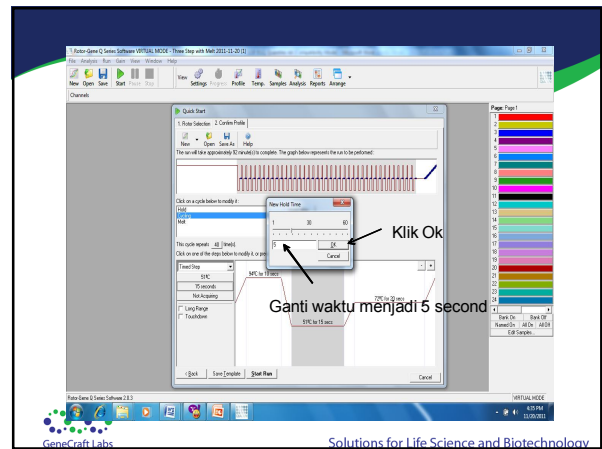
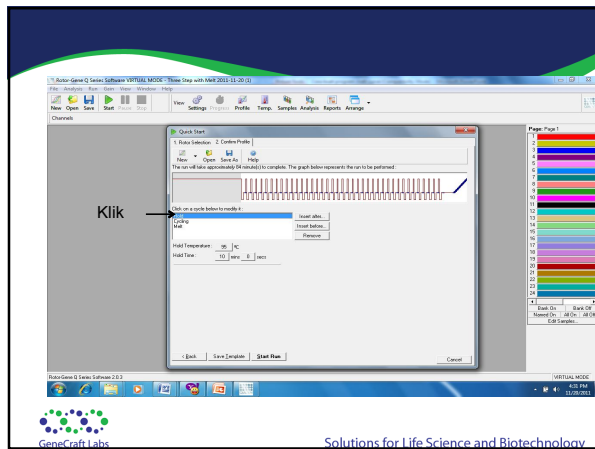
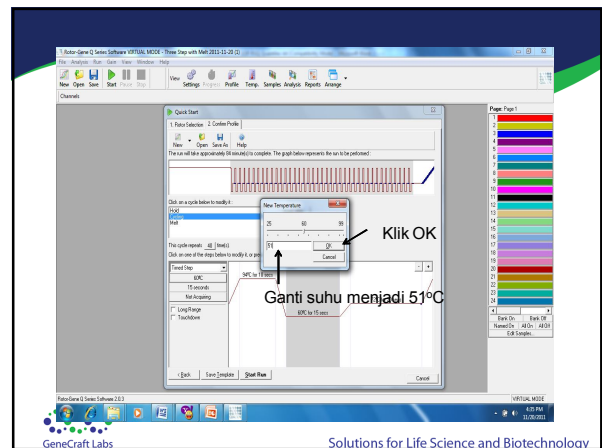
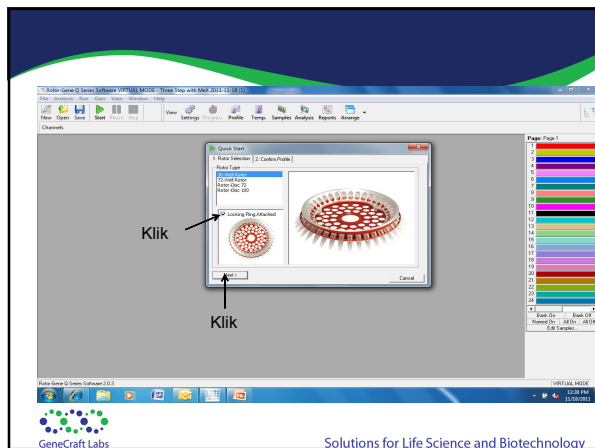
Solutions for Life Science and Biotechnology

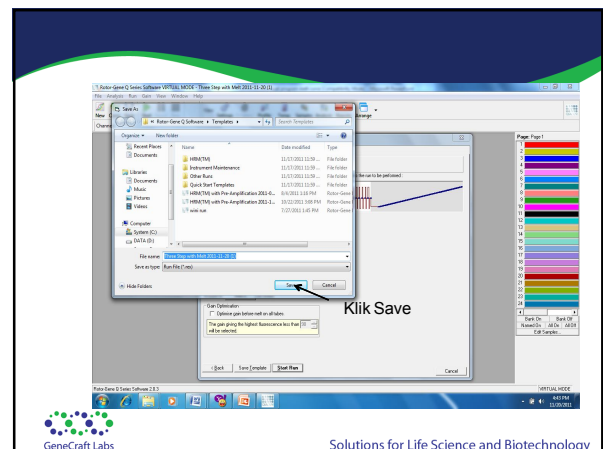
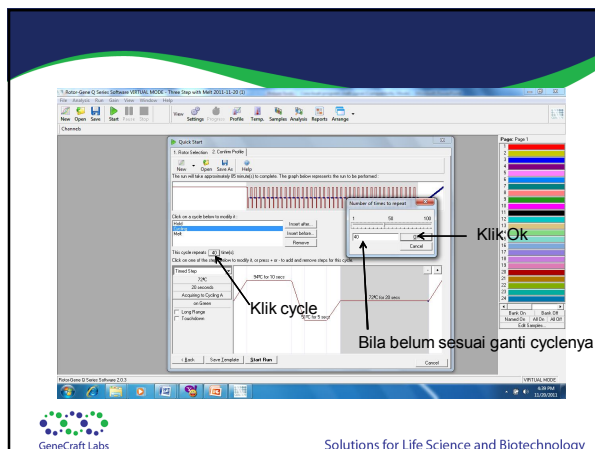
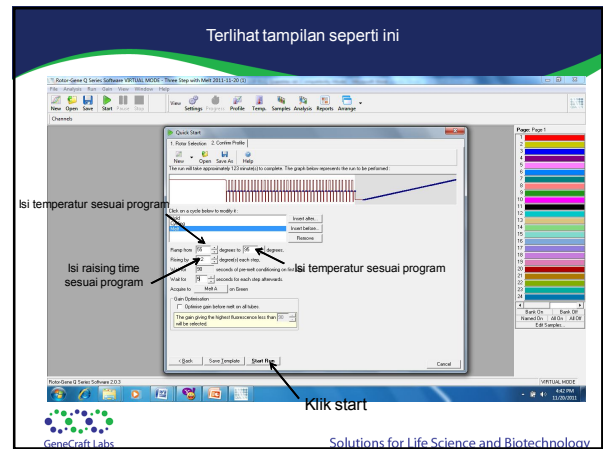
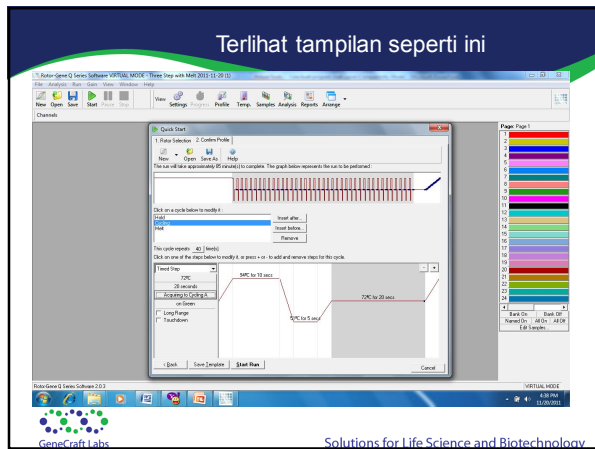
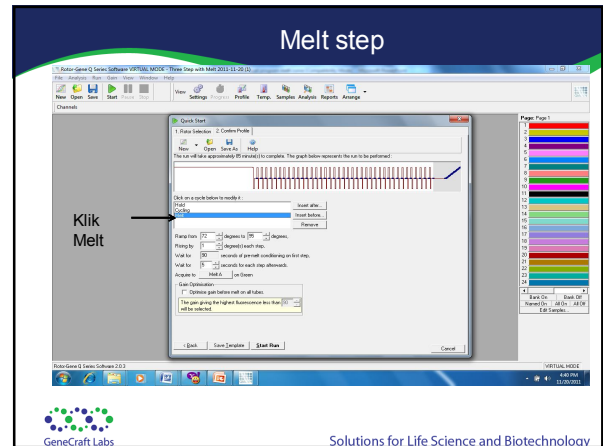
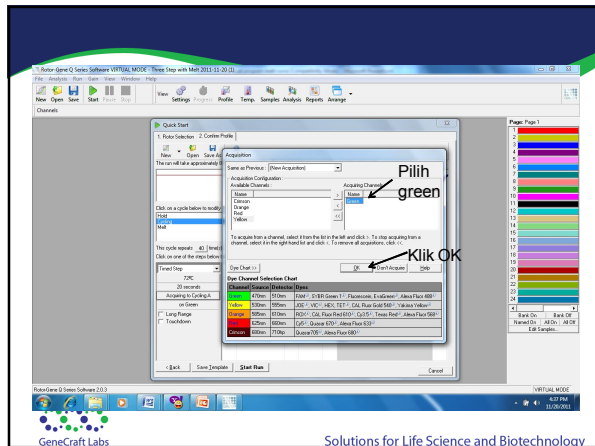
Analisis

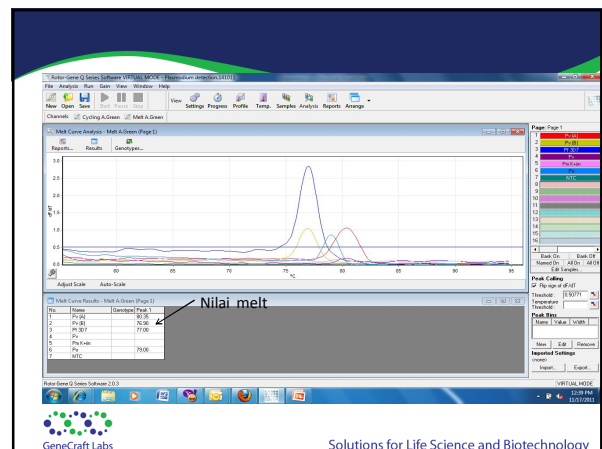
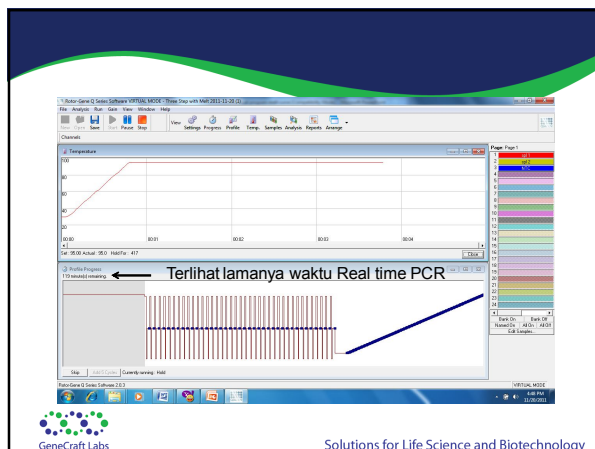
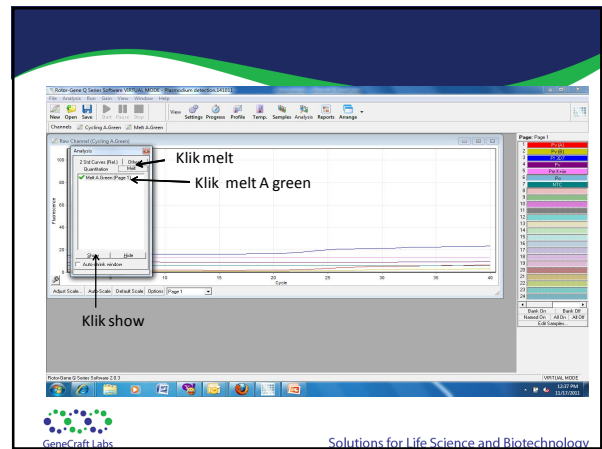
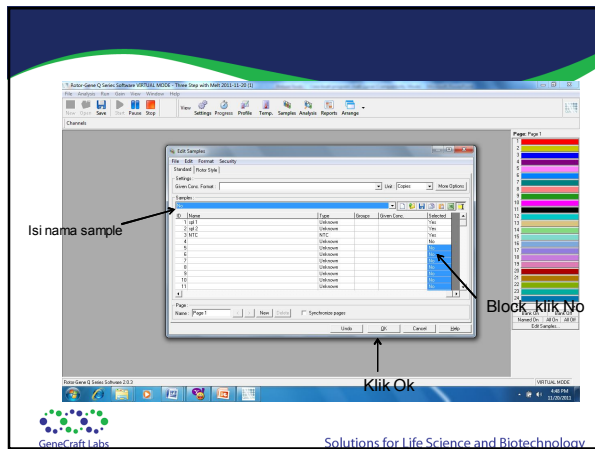
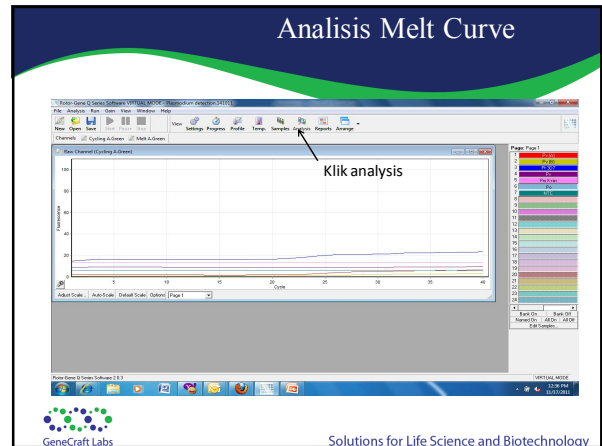
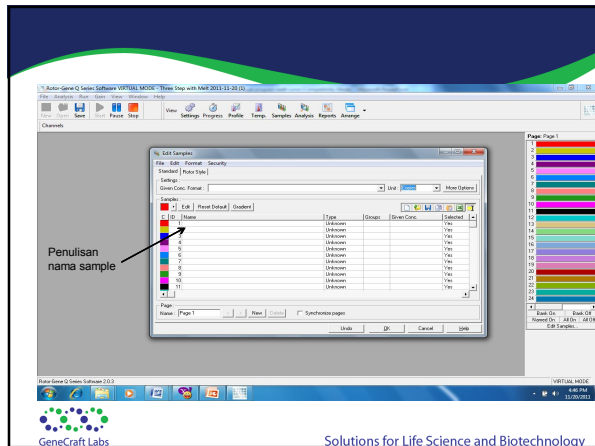


Cara Pembuatan Program Melt curve









Report

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

Close

- Close program dan matikan mesin Real Time

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

Report

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

Rotor-Gene Q Applications Genotyping Applications

What is High Resolution Melting (HRM)?

Characterization of nucleic acid samples according to their detailed strand dissociation (melt) behavior using an intercalating dye

- Distinguishes samples with different sequence, length, GC content
- Sample characterization by melt curve shape and melt temperature
- Many emerging applications:
 - Genotyping
 - Quantitative DNA methylation analysis
 - Gene scanning
 - Sequence matching

The Rotor-Gene Q HRM option features:

- A high-intensity optical HRM channel
- An outstanding thermal resolution of 0.02°C
- High data acquisition rates
- A comprehensive HRM software package

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

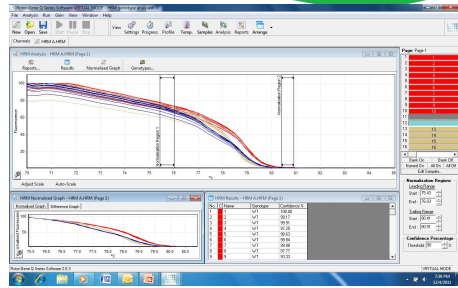
Hasil Report

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

PROGRAM HRM

GeneCraft Labs Solutions for Life Science and Biotechnology

HRM Result



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Analysis

a. Adjust Threshold manual yang harus diperhatikan:

- Ntc
- Neg kontrol
- Positif kontrol

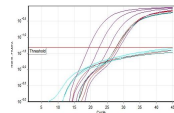
b. Automatic---jika ada standard curve



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING

1. Analisis

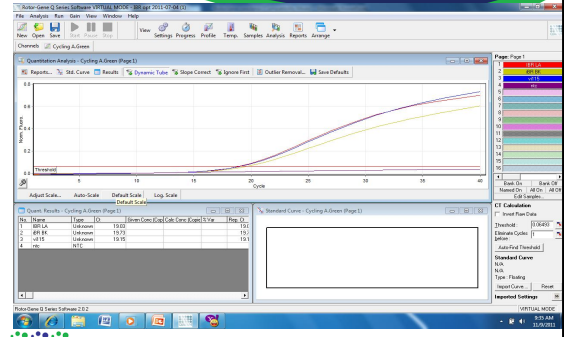


2. Instrument



Solutions for Life Science and Biotechnology

Adjust threshold manual



Solutions for Life Science and Biotechnology

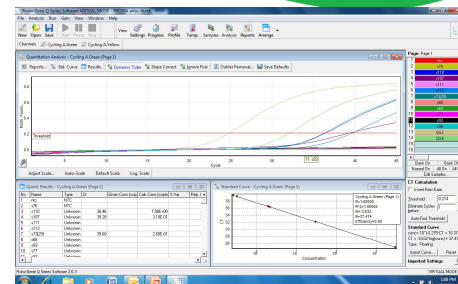
TROUBLESHOOTING Analysis

1. Kesulitan adjust threshold
2. Bentuk curva yang tidak baik/tidak biasa
Sebab antara lain: pipetting error, tube terbuka, detector rusak
3. NTC kontaminasi
4. Reagent yang kurang baik



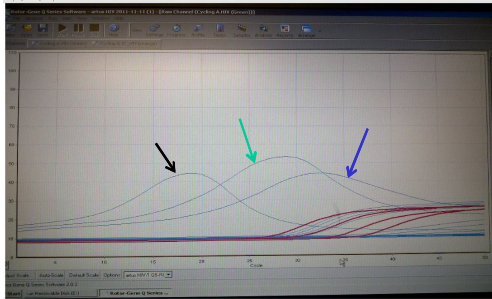
Solutions for Life Science and Biotechnology

Adjust threshold automatic



Solutions for Life Science and Biotechnology

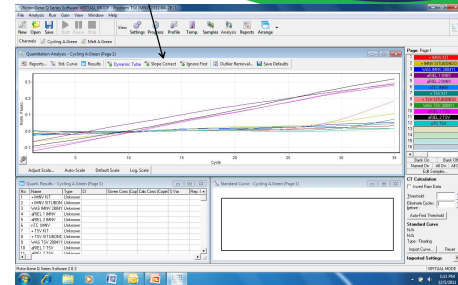
TROUBLESHOOTING Analysis



Solutions for Life Science and Biotechnology

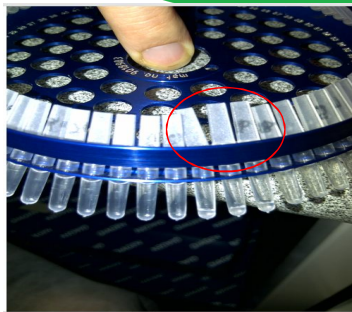
TROUBLESHOOTING Analysis

Klik slope correct



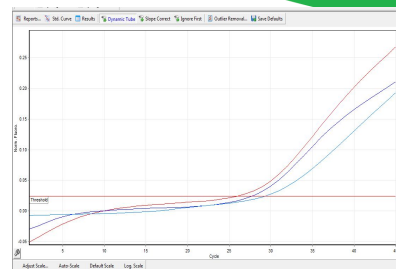
Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Analysis



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING NTC Kontaminasi



1. Ntc--Merah
2. Sample 1--Biru tua
3. Pos ---Biru muda

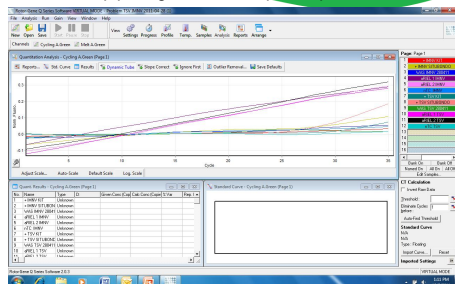
Langkah yang diambil: harus ulang Real time PCR



Solutions for Life Science and Biotechnology

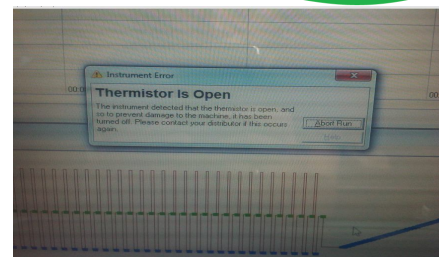
TROUBLESHOOTING Analysis

Kesalahan pipetting untuk beberapa sample



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Instrument



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Instrument

- Penyebab:
Masalah pada thermistor dalam chamber terlalu tinggi
- Hold pada 95°C—10 min—masih berjalan baik
Cycle 1 :step : denaturation 95 °C---10 sec—masih berjalan baik
Masuk step annealing 51 °C---30 sec---Error
- Saran: contact technical service



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Instrument

Troubleshooting

Comments and suggestions

Can't open the serial port COMx

This error occurs on software startup if the software cannot communicate with the instrument via the configured COM port. This is commonly caused by faulty cables, loose cables, faulty serial ports, faulty USB ports, a USB driver problem, or a USB-to-serial converter driver problem.

Reconnect or replace the cable. Reinstall the appropriate drivers. Start the software in "Virtual Mode" and select "Setup/Auto-Detect button" from the "File" menu to reset the configured COM port.



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Instrument

Ketika running tube pecah

Sebab: tidak pernah dikalibrasi, frekuensi running sample sering

Kerusakan: pada thermistor heater



Solutions for Life Science and Biotechnology

Prosedur Perawatan Rotorgene



Solutions for Life Science and Biotechnology

TROUBLESHOOTING Instrument

Troubleshooting

12.3 Rotor-Gene Q troubleshooting

Comments and suggestions

General instrument errors

Machine unplugged (serial timeout error)

This error occurs if the instrument does not communicate with the software after a defined timeout interval. It is often caused by an instrument fault or by excessive activity from the PC, which causes a packet to be lost.

Common software-related causes include processor-intensive tasks, such as antivirus resident protection or antivirus scheduled scans, wireless cards, or infrared cards.

Disable or uninstall the relevant processor-intensive software/task. Common instrument-related causes include faulty USB/serial cables or loose USB/serial cables. Reconnect or replace the cable.

Object variable or with block variable not set

This error occurs on software startup if the default experiment template file has become corrupt. This may happen if the software/computer is shut down without exiting correctly, for example, during a power outage.

Delete the file C:\Program Files\Rotor-Gene 6000 Software\Templates\normal.rot and then restart the software.



Solutions for Life Science and Biotechnology

Maintenance

1. Membersihkan lensa, lokasi di emisi dan deteksi dengan cotton bud yang diberi ethanol 70%
2. Membersihkan lensa dilakukan setiap 1 bulan sekali tergantung dari penggunaan.
3. Bersihkan juga rotor chamber dengan ethanol 70% dengan cara di lap dengan tissue halus



Solutions for Life Science and Biotechnology

Maintenance

4. Untuk menghindari debu sebaiknya rotorgene ditutup bila tidak digunakan
5. Untuk menghindari kontaminasi rotor chamber dibersihkan dengan 0.1% bleach, setelah itu dilap dengan PCR grade water menggunakan tissue halus



Solutions for Life Science and Biotechnology



Kalibrasi



Solutions for Life Science and Biotechnology

Maintenance



Solutions for Life Science and Biotechnology

OPTIC TEMPERATURE VERIFICATION (OTV)

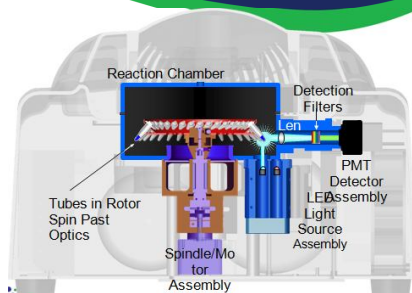


- Untuk laboratorium yang terakreditasi
- OTV adalah metode untuk verifikasi temperatur.
- OTV system terdiri dari OTV Disc, optical insert accessories and a CD
- Verification dari instrument dapat dilakukan sampai 30 kali sampai masa expire kit 6 bulan.



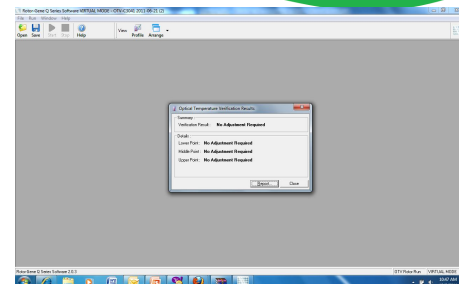
Solutions for Life Science and Biotechnology

Maintenance



Solutions for Life Science and Biotechnology

OTV Calibration



Solutions for Life Science and Biotechnology

OTV Calibration

Summary: Adjustment Recommended

Date:

Sample Type: No Adjustment Required

Batch Part: No Adjustment Required

Batch Test: Adjustment Required

Batch Adjustment: []

OK Cancel

Terima kasih

Report Kalibrasi yang membutuhkan adjustment

www.gene-craft.com

OTV-C3041 Run Results

Summary

Summary Information	
Instrument Status	Adjustment Recommended
Instrument Serial Number	070966
OTV Rawer Seed Code	OTV-C3041-39FC-095362-ASB-KD18
OTV Rawer Expiry Date	31 Oct 2011
Results Filename	C:\Users\user\AppData\LocalTemp\RunR01E1-ED0\OTV-C3041-2011-06-21 (1).xml
Start Time	21 Jun 2011 08:59:41
Finish Time	21 Jun 2011 08:58:59
Run Signature	Run Raw Signature is valid
User	Tomy
Company	Biodi

Perlu adjustment

Temperature Verification Points

Temperature Status	Amount
58.0°C	Confirms
75.0°C	Confirms
95.0°C	Adjustment Recommended - 4.7°C

This report generated by Gene-Craft's Gene Software 2.0.0 (Build 2)
Copyright © 2008 Corbett, Life Science, a GeneCRAFT company. All rights reserved.

GeneCraft Labs

Solutions for Life Science and Biotechnology

Report kalibrasi yang tidak memerlukan adjustment

www.gcgene.com

OTV-C3041 Validation Run Results



Summary

Summary Information	
Instrument Status	Not Adjustment Required ←
Instrument Serial Number	07999
OTV Run Seed Code	OTV-C3041-11FC-216-162-A4B-ED10
OTV Run Entry Date	31 Oct 2011
Results Filename	C:\Users\user\AppData\Local\Temp\Bae5D43-83207-C3041-2011-06-21 (2).xml
Run Time	21 June 2011 08:53:37
Finish Time	21 Jun 2011 09:31:46
Run Signature	The Run Signature is valid.
User	Tomy
Company	Bioass

Temperature Verification Points

Temperature Range
30.0°C Confirms
75.0°C Confirms
90.0°C Confirms

This report generated by: Rotor-Gene 6 Series Software 2.0.3 (20442)
Copyright © 2004-2011 Corbett Research, a QIAGEN Company. All rights reserved.

Solutions for Life Science and Biotechnology

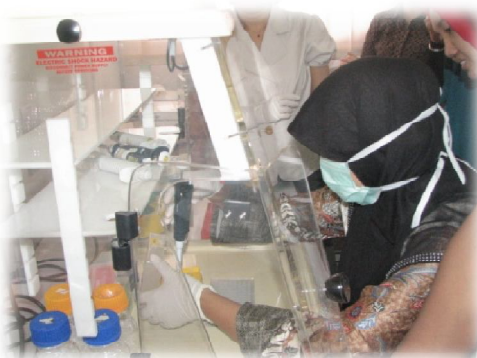
LAMPIRAN 8.

**Foto Dokumentasi Kegiatan Apresiasi
Peningkatan Kompetensi Uji
Mikrobiologi Real Time PCR
Rotorgene dan Step One**

**FOTO KEGIATAN APRESIASI PENINGKATAN KOMPETENSI UJI
MIKROBIOLOGI PENGGUNAAN REAL TIME PCR ROTORGENE DAN
*APPLIED BIOSYSTEM STEP ONE***



**FOTO KEGIATAN APRESIASI PENINGKATAN KOMPETENSI UJI
MIKROBIOLOGI PENGGUNAAN REAL TIME PCR ROTORGENE DAN
*APPLIED BIOSYSTEM STEP ONE***



**FOTO KEGIATAN APRESIASI PENINGKATAN KOMPETENSI UJI
MIKROBIOLOGI PENGGUNAAN REAL TIME PCR ROTORGENE DAN
*APPLIED BIOSYSTEM STEP ONE***

